



Influence des perturbations métaboliques sur des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale

Adrien Combes

► To cite this version:

Adrien Combes. Influence des perturbations métaboliques sur des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. <NNT : 2015LIL2S045>. <tel-01326665>

HAL Id: tel-01326665

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01326665>

Submitted on 4 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE LILLE 2 – DROIT et SANTE

Ecole doctorale Biologie Santé (ED n°446)

Faculté des Sciences du Sport et de l'Education Physique

Année universitaire : 2015-2016

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur

Discipline : Sciences du vivant
Domaine : Physiologie de l'exercice

Soutenue le 16 novembre 2015, par

Adrien COMBES

**Influence des perturbations métaboliques sur des voies de signalisation
impliquées dans la biogenèse mitochondriale.**

Sous la direction de Frédéric DAUSSIN

Membres du jury :

Directeur : DAUSSIN Frédéric – MCF, Université de Lille 2

Rapporteur : GOUSPILLOU Gilles – PU, Université du Québec à Montréal

Rapporteur : FAVRET Fabrice – PU, Université de Strasbourg

Examineur : AHMAIDI Saïd – PU, Université de Picardie Jules Vernes

Examineur : MUCCI Patrick – PU, Université de Lille 2

Examineur : JUNIUS-THOMAS Claire – MCF, Université d'Evry Val d'Essonne

Examineur : LANCEL Steeve – MCF, Université de Lille 2

Examineur : BOUGAULT Valérie – MCF, Université de Lille 2

Remerciements

A

M. le professeur Gilles GOUSPILLOU

M. le professeur Fabrice FAVRET

Je vous remercie d'avoir accepté de rapporter ce travail.

Serge BERTHOIN, je te remercie d'avoir œuvré au quotidien pour que nous travaillions dans les meilleures conditions possibles.

Jeanne DEKERLE, grâce à toi, nous avons pu réaliser nos protocoles à Eastbourne, dans l'université de Brighton, et tu as enrichi chacun de nos séjours.

Valérie BOUGAULT, les circonstances t'ont mise sur le chemin de ma thèse et je m'en réjouis.

Frédéric DAUSSIN, je crois que je l'ai dit à tout le monde alors il est temps que je te le dise aussi : j'ai beaucoup de chance de t'avoir eu comme directeur de thèse et je n'aurai pas pu tomber mieux.

Les chercheurs et jeunes chercheurs de notre laboratoire à Lille 1, vous m'avez accueilli chaleureusement, conseillé et rendu les passages au laboratoire plaisant.

Je remercie aussi **tous les autres**, tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la bonne réalisation de ma thèse, vos noms ne sont pas écrits mais vous comptez aussi beaucoup.

Résumé

La sédentarité et les maladies métaboliques induisent une réduction de la capacité du muscle squelettique à produire de l'énergie aérobie. Néanmoins, l'activité physique peut améliorer rapidement les capacités oxydatives musculaires, dont les mitochondries sont un élément majeur. La compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la biogenèse et la fonction mitochondriale est nécessaire pour prescrire au mieux l'activité physique. Ces dernières années, la modalité d'exercice intermittente est de plus en plus utilisée. Plusieurs arguments sont mis en avant pour la préconiser : 1) le temps passé au ou proche du $\dot{V}O_{2max}$, 2) la haute intensité, et 3) les perturbations métaboliques induites par les variations d'intensité au cours de l'exercice. Cependant, l'influence des perturbations métaboliques sur les capacités oxydatives musculaires n'a pas encore été clairement démontrée. Mes travaux de thèse se sont donc focalisés sur ces perturbations métaboliques et leurs effets sur des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale. Deux protocoles nous ont permis ces investigations.

Le premier protocole nous a permis d'identifier la durée de cycle 60s:60s comme induisant le plus de variations métaboliques comparée aux cycles 30s:30s et 120s:120s, pour une dépense énergétique identique. Mais aussi, que la répétition de changement d'intensité avec l'exercice intermittent (30 x 1min à 70%WR_{pic} / 1min de repos passif) créait plus de perturbations du métabolisme comparé à la réalisation de la même quantité de travail en continu (1 bloc de 30min à 70%WR_{pic}). Au cours du deuxième protocole, nous avons comparé ces deux derniers exercices au niveau cellulaire. La modalité intermittente (i.e. plus grandes perturbations du métabolisme) a entraîné une phosphorylation supérieure de l'AMPK, CaMKII et p38 MAPK comparé à la modalité continue. Ces kinases sont situées en amont de PGC-1 α , un important régulateur de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique. Ces résultats mettent donc en évidence un effet spécifique des perturbations métaboliques sur ces voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale.

Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives sur les méthodes de réentraînement de personnes sédentaires ou atteintes de pathologies chroniques. Les futurs travaux viseront à confirmer nos résultats lors d'interventions chroniques et d'explorer ces effets chez différentes populations.

Sommaire

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES.....	13
1. La mitochondrie	13
1.1. Structure.....	13
1.2. Production de composés à haute énergie	15
1.2.1. Phosphorylation oxydative	16
1.2.2. Oxydation des substrats	17
1.2.2.1. La voie du pyruvate.....	18
1.2.2.2. La voie des acides gras.....	19
1.2.2.3. La voie des acides aminés	21
1.2.2.4. La navette malate/aspartate	22
1.2.2.5. La navette du Glycérol-3-Phosphate	22
1.3. Transfert d'énergie.....	23
1.3.1. Créatine Kinase.....	23
1.3.2. Adénylate Kinase.....	25
1.4. Apoptose	25
1.5. Spécificité	27
1.5.1. Sous-populations mitochondriales.....	27
1.5.2. Typologie musculaire	28
1.6. Dynamique.....	29
2. Biogenèse mitochondriale	31
2.1. ADN mitochondrial	32
2.2. ARN polymérase	33
2.3. Facteurs de transcription.....	34
2.3.1. Tfam et les TFBMs.....	34
2.3.2. NRFs.....	35
2.4. Cofacteurs de transcription	36
2.4.1. HDACs	37
2.4.2. SIRTs	38
2.4.3. PGC-1 α	38
2.4.3.1. Découverte	38
2.4.3.2. Implication dans la biogenèse mitochondriale	39
2.4.3.2.1. Médiation des deux génomes.....	39
2.4.3.2.2. Fonctionnement de la mitochondrie	40
2.4.3.3. Transcription du gène PGC-1 α	41
2.4.3.3.1. Site MEF-2.....	41
2.4.3.3.2. Site CRE	42
2.4.3.4. Activation de la protéine PGC-1 α	42
2.5. Les effets de l'entraînement.....	44
3. Couplage excitation-transcription	51
3.1. Perturbations cellulaires.....	52
3.2. Kinases.....	52
3.2.1. AMPK.....	53
3.2.1.1. Composition	53
3.2.1.2. Activation	54
3.2.1.3. Inhibition	58
3.2.1.4. Stabilité	58
3.2.1.5. Localisation	59
3.2.1.6. Implication dans la biogenèse mitochondriale	60

3.2.1.6.1. Lien avec PGC-1 α	61
3.2.1.6.2. Lien avec CREB	62
3.2.1.6.3. Lien avec HDAC5	63
3.2.1.6.4. Lien avec SIRT1	64
3.2.2. CaMKII	67
3.2.2.1. Composition	67
3.2.2.2. Auto -inhibition et -activation	68
3.2.2.3. Implication dans la biogenèse mitochondriale	70
3.2.2.3.1. Lien avec CREB	70
3.2.2.3.2. Lien avec les HDACs classe II	71
3.2.2.3.3. Lien avec p38-MAPK	72
3.2.3. p38-MAPK	73
3.2.3.1. Composition	73
3.2.3.2. Localisation cellulaire	74
3.2.3.3. Activation	75
3.2.3.3.1. Phosphorylation	75
3.2.3.3.2. Autophosphorylation	76
3.2.3.4. Inhibition	77
3.2.3.5. Implication dans la biogenèse mitochondriale	77
3.2.3.5.1. Lien avec PGC-1 α	77
3.2.3.5.2. Lien avec ATF-2	79
3.2.3.5.3. Lien avec MEF-2	80
3.3. Cascade excitation-transcription	82
3.4. Influence des caractéristiques de l'exercice	84
3.4.1. Intensité	86
3.4.1.1. Exercice aigu	86
3.4.1.2. Exercices chroniques	88
3.4.2. Modalité	91
OBJECTIFS SCIENTIFIQUES	96
MATERIELS ET METHODES	99
1. Protocole 1	99
1.1. Sujets	99
1.2. Schéma général du protocole	99
1.3. Critères d'inclusion	100
1.4. Test et essais	101
1.4.1. Test incrémental	101
1.4.2. Protocole des exercices	101
2. Protocole 2	101
2.1. Sujets	101
2.2. Schéma général du protocole	102
2.3. Critères d'inclusion	102
2.4. Test et essais	102
2.4.1. Test incrémental	102
2.4.2. Protocole des exercices	102
3. Appareils et analyses	103
3.1. Puissance et fréquence de pédalage	103
3.2. Echanges gazeux	104
3.3. Concentrations sanguines en lactate	105
3.4. Perception de l'effort	105

3.5. Fréquence cardiaque	105
3.6. Electromyographie (EMG)	105
3.7. Spectroscopie du proche infra-rouge (NIRS)	106
3.8. Biopsies musculaires	107
3.9. Western blot.....	108
4. Analyses statistiques.....	108
4.1. Etude 1	108
4.2. Etude 2	109
4.3. Etude 3	109
RESULTATS ET DISCUSSION	110
1. Etude 1.....	110
1.1. Résultats.....	110
1.2. Discussion.....	114
2. Etude 2.....	119
2.1. Résultats.....	119
2.2. Discussion.....	123
3. Etude 3.....	127
3.1. Résultats.....	127
3.2. Discussion.....	128
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	133
BIBLIOGRAPHIE	139

Liste des publications

Article publié (en annexe) :

Combes A, Dekerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN (2015) Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiological reports* 3:e12462. doi 10.14814/phy2.12462

Article soumis (en annexe) :

Combes A, Dekerle J, Bougault V, Daussin FN - Characterization of $\dot{V}O_2$ fluctuations during intermittent exercise.

Article en cours d'écriture :

Combes A, Dekerle J, Bougault V, Daussin FN – Comparison of metabolic responses between intermittent and continuous exercises realized at a same intensity.

Abréviations

ACC : acetyl-CoA carboxylase	57
ACS2 : l'acétyl-CoA synthétase 2.....	38
acyl-CoA : acyl-coenzyme A	19
ADN : acide désoxyribonucléique	13
ADNmt : ADN mitochondrial	32
ADP : adénosine di-phosphate	14
AK : adenylate kinase.....	25
AMP : adénosine mono-phosphate.....	25
AMPK : AMP-activated protein kinase	53
AMPKK : AMPK kinase.....	57
ANT : l'adénine nucléotide translocase	14
ARN : acide ribonucléique.....	14
ARNm : ARN messenger.....	33
ARNP : ARN polymérase	33
ARNPmt : ARNP mitochondrial	33
ARNr : ARN ribosomique.....	32
ARNt : ARN de transfert.....	32
ATP : adénosine-5'-triphosphate	13
Ca ²⁺ : calcium	52
CaMKII : Ca ²⁺ /calmoduline-dependante protein kinase II	53
CBS : cystathionine-b-synthase.....	57
CK : créatine kinase	24
CoA: coenzyme A	19
Cox : cytochrome c oxydase	15
CPTI : carnitine palmitoyl-transférase I.....	19
Cr : créatine	24
CS : Citrate Synthase.....	44
Cyt c : cytochrome c.....	16
FAD ₂ ⁺ : flavine adénine di-nucléotide oxydé	15
FADH ₂ : flavine adénine di-nucléotide réduit.....	15
G3-P : Glycérol-3-Phosphate	17
H ⁺ : proton	16
H ₂ O : eau	16
HSP1 : Heavy Strand Promotor 1	32
HSP2 : Heavy Strand Promotor 2	32
IMF : intermyofibrillar - intermyofibrillaires.....	27
KO : Knock-Out	40
LSP : Light Strand Promotor.....	32
NAD ⁺ : nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé.....	15
NADH : nicotinamide adénine di-nucléotide réduit.....	15
O ₂ : oxygène	16
p38-MAPK : p38-Mitogen-activated protein kinase.....	53
PCr : phosphocréatine	24
PDH : pyruvate déshydrogénase	18
Pi : phosphate	16
PP2Cα : Protein Phosphatase 2C alpha.....	57
PPARγ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma.....	39

PTP : pore de transition de perméabilité	26
Ser485/491 : Serine 485/491	54
SS : subsarcolemmal - sous-sarcolemmique	27
Tfam : Mitochondrial transcription factor A.....	33
TFB2M : Mitochondrial transcription factor B 2	33
Thr172 : Thréonine 172.....	54
TOM : translocase membranaire	14
UCP : uncoupling protein.....	14
VDAC : Voltage-Dependent Anion-selective Channel.....	26
β-oxydation : bêta-oxydation	17

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'une coupe transversale d'une mitochondrie.	14
Figure 2. Schéma représentant la production de composés à haute énergie	15
Figure 3. Chaîne de transport des électrons.	17
Figure 4. Les différents substrats utilisés par la mitochondrie	18
Figure 5. Cycle de Krebs	19
Figure 6. Beta-oxydation	20
Figure 7. La voie des acides aminés	21
Figure 8. Navette malate/aspartate	22
Figure 9. Navette Glycérol-3-Phosphate	23
Figure 10. Système créatine Kinase	24
Figure 11. Voies de l'apoptose dépendantes et indépendantes des caspases	26
Figure 12. Mitochondries subsarcolemmales et inter-fibrillaires vues au microscope.	27
Figure 13. Fusion et scission mitochondriale	30
Figure 14. ADN mitochondrial	33
Figure 15. Implication des NRFs dans la transcription des gènes mitochondriaux	36
Figure 16. Dé-acétylation des histones par les HDACs	37
Figure 17. Gène PGC-1 α	41
Figure 18. Interaction SIRT-1-PGC1 α	43
Figure 19. Couplage excitation-transcription.	51
Figure 20. Sous unités de l'AMPK	54
Figure 21. Les différentes voies d'activation et d'inhibition de l'AMPK	56
Figure 22. Voie de l'AMPK	61
Figure 23. Relation entre AMPK et SIRT1	65
Figure 24. Composition de la protéine CaMKII	68
Figure 25. Oligomère CaMK	68
Figure 26. Interaction de CaMKII avec CaM et phosphorylation	69
Figure 27. Voie de CaMKII.	70
Figure 28. Levée d'inhibition des HDACs sur MEF-2	71
Figure 29. Composition des MAPKs	74
Figure 30. Voie de p38-MAPK.	78
Figure 31. Cascade de la biogenèse mitochondriale	82
Figure 32. Evolution de l'expression des ARNm et de la protéine PGC-1 α dans le temps	83
Figure 33. Evolution de l'expression des ARNm et de la protéine Cox-IV dans le temps.	84
Figure 34. Exercices du protocole 1	100
Figure 35. Test incrémental	101
Figure 36. Exercices du protocole 2	103
Figure 37. Réponses représentatives de $\dot{V}O_2$	111
Figure 38. Quantification des fluctuations de $\dot{V}O_2$	113
Figure 39. Réponses représentatives de $\dot{V}O_2$	120
Figure 40. Quantification des fluctuations de $\dot{V}O_2$	120
Figure 41. Quantification des fluctuations de HHb	121
Figure 42. Activation des voies de signalisation	128

Liste des tableaux

Tableau 1. Complexes de la chaîne de transport des électrons	16
Tableau 2. Effets de l'entraînement, sur ergocycle, sur la biogenèse mitochondriale, chez l'homme	47
Tableau 3. Effet de l'intensité de l'exercice sur la biogenèse mitochondriale	90
Tableau 4. Effet de la modalité d'exercice sur la signalisation.....	93
Tableau 5. Réponses moyennes des trois exercices intermittents (70% du taux de travail maximal, 3 durées de cycle travail sur repos de ratio 1:1).	112
Tableau 6. Concentration de lactate sanguin et échelle de Borg de perception de l'effort (RPE) durant les 3 exercices intermittents (70% du taux de travail maximal, durées de cycle travail sur repos de ratio 1:1).....	114
Tableau 7. EMG	122
Tableau 8. Concentration de lactate sanguin et perception de l'effort via l'échelle de Borg (RPE) durant les 2 exercices (70%WR _{pic}).....	123

Préambule

Depuis plus d'une décennie, les populations des pays occidentaux deviennent de plus en plus sédentaires, obèses et âgées. Elles voient donc augmenter leurs problèmes de santé à court et à long terme entraînant des impacts sociétaux néfastes. La préoccupation grandissante, concernant ces problèmes de santé et sociétaux, a alimenté un regain de la recherche sur le métabolisme. Un élément central dans ces différents processus est la capacité aérobie des personnes. En réponse à la sédentarité et au vieillissement, la capacité aérobie est diminuée et est associée, par exemple, à une fatigabilité accrue et à une insulino-résistance. Cependant, la capacité aérobie est un paramètre très plastique et elle peut s'améliorer par l'activité physique. L'étude des mitochondries du muscle squelettique, éléments majeurs de la capacité respiratoire, est donc devenue une des orientations principales de la recherche sur le métabolisme. Compte tenu de l'implication potentielle des mitochondries dans la pathogenèse de nombreuses maladies et dans le processus de vieillissement, la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent leur biogenèse et leur fonctionnement peut ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques importantes. Aujourd'hui, la prescription de l'activité physique est un élément incontournable dans l'amélioration des conditions de vie des patients. Elle permet également de diminuer les effets délétères de la sédentarité, d'une nutrition inadaptée et du vieillissement. Cependant, de nombreuses recherches doivent être menées pour identifier le type d'exercice à proposer en fonction de l'effet recherché.

C'est dans ce souci d'accroître les connaissances sur les facteurs impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale que j'ai choisi d'effectuer mes travaux de thèse. L'objectif principal était d'identifier l'influence des variations métaboliques au cours de l'exercice sur des voies de signalisation de la biogenèse mitochondriale. Dans une première partie, je présenterai un état des connaissances actuelles sur la mitochondrie et les mécanismes de sa biogenèse d'une part, l'influence des caractéristiques de l'exercice sur la biogenèse mitochondriale d'autre part. Dans une seconde partie, je présenterai et discuterai les travaux que j'ai effectués au cours de ma thèse.

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES

1. La mitochondrie

D'après la théorie endosymbiotique, les mitochondries proviennent de l'ingestion de bactéries par des cellules primitives, ce qui a conduit à une relation de coopération mutuellement bénéfique. La découverte d'acide désoxyribonucléique (ADN) dans les mitochondries, différent de celui présent dans le noyau de la cellule (Nass and Nass 1963), a été le premier élément appuyant cette hypothèse.

La mitochondrie est une organelle contenue dans le cytoplasme de la cellule, aux fonctions bien précises et délimitée par une membrane phospholipidique. Dans le muscle vaste latéral d'un homme actif, les mitochondries représentent 3 à 6% du volume des fibres musculaires (Hoppeler et al. 1973; Hoppeler 1986). Leur rôle majeur est la production de composés à haute énergie. L'oxydation des substrats organiques, comme le glucose, libère de l'énergie qui est mise en réserve sous forme d'un composé à potentiel énergétique élevé : l'adénosine-5'-triphosphate (ATP). Les mitochondries possèdent aussi d'autres rôles vitaux pour la cellule comme la thermogenèse et la régulation du potentiel hydrogène (pH) intracellulaire (Vidal-Puig et al. 1997; Brooks et al. 1999). Elles semblent également avoir un rôle important dans le vieillissement cellulaire et la pathologie (Conley et al. 2007). Les mitochondries apparaissent comme impliquées dans de nombreuses maladies dégénératives liées à l'âge comme la maladie de Parkinson (Luft 1994), ainsi que dans une grande variété de troubles métaboliques tels que l'obésité (Bruce et al. 2006; Wells et al. 2008) ou le diabète de type 2 (Mogensen et al. 2007).

1.1. Structure

L'observation de mitochondries au microscope électronique permet de les décrire : de forme sphérique ou oblongue, leur taille varie de 1 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large ([figure 1](#)). Elles sont formées de deux membranes superposées entre lesquelles se situe l'espace inter-membranaire. A l'intérieur de la membrane interne, la mitochondrie contient un espace matriciel.

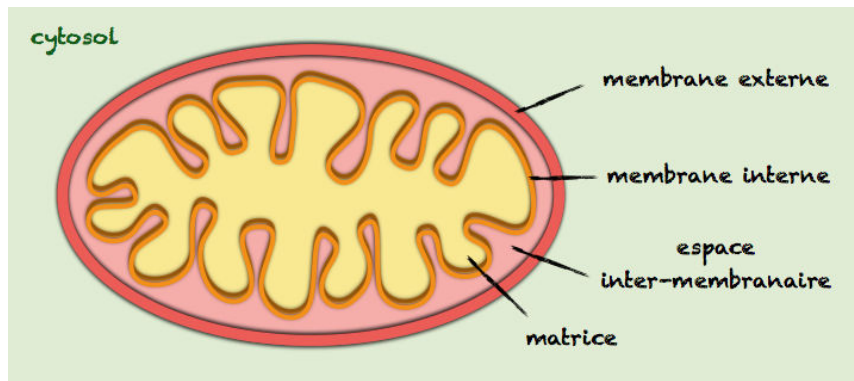


Figure 1. Représentation schématique d'une coupe transversale d'une mitochondrie

La membrane externe, rigide, sert de délimitation avec le cytoplasme. Elle comprend un nombre important de protéines assemblées, de porines et translocases membranaires (TOM), qui permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire.

L'espace inter-membranaire, délimité par les deux membranes, contient des protéines qui participent à l'énergie mitochondriale. On y met en évidence des enzymes de type kinases qui catalysent la phosphorylation de diverses molécules, dont en particulier l'adénylate kinase qui catalyse la phosphorylation de l'adénosine di-phosphate (ADP) en ATP.

La membrane interne est repliée de telle façon qu'elle crée de nombreuses invaginations permettant d'accroître sa surface sans augmenter le volume de la mitochondrie. C'est sur cette membrane interne que sont localisées : 1) les complexes de la respiration cellulaire, dont le but est la formation d'ATP, 2) l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet d'importer de l'ADP dans la matrice et d'exporter de l'ATP dans le cytosol, et 3) les protéines découplantes (UCP) qui contribuent à la production de chaleur avec la fuite des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice.

La matrice est, quant à elle, un fluide dense contenant des polynucléotides (ADN et acide ribonucléique (ARN)), des nucléotides phosphates (ADP et ATP), des enzymes et des coenzymes.

1.2. Production de composés à haute énergie

Les réactions enzymatiques d'oxydation des substrats énergétiques et la chaîne de transport des électrons (ou chaîne respiratoire) sont les deux points clefs de la production de composés à haute énergie. L'oxydation des substrats par le cycle de Krebs ou la β -oxydation entraîne la réduction du nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé (NAD^+) en nicotinamide adénine di-nucléotide réduit (NADH) et/ou du flavine adénine di-nucléotide oxydé (FAD) en flavine adénine di-nucléotide réduit (FADH_2). Ces intermédiaires ont pour rôle de fournir des électrons à la chaîne respiratoire dont le but est de former de l'ATP (figure 2).

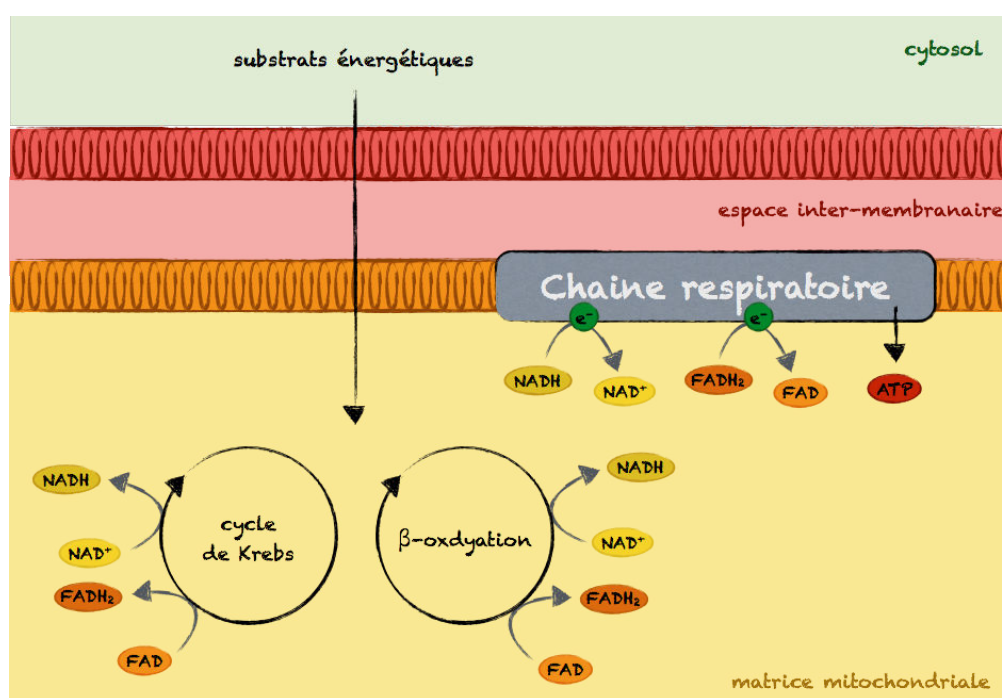


Figure 2. Schéma représentant la production de composés à haute énergie dans la mitochondrie

NADH , nicotinamide adénine di-nucléotide réduit ; NAD^+ , nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; FADH_2 , flavine adénine di-nucléotide réduit ; FAD , flavine adénine di-nucléotide oxydé ; ADP , adénosine di-phosphate ; Pi , phosphate inorganique ; ATP , adénosine-5'-triphosphate ; e^- , électron.

La chaîne de transfert des électrons est composée de quatre complexes : le complexe I (ou NADH déhydrogénase), le complexe II (ou succinate déhydrogénase), le complexe III (ou ubiquinol cytochrome c réductase) et le complexe IV (ou cytochrome c oxydase, Cox) (tableau 1) (figure 3).

Tableau 1. Complexes de la chaîne de transfert des électrons et complexe V

	Fonction enzymatique	Poids moléculaire (kDa)	Nombre de sous-unités
Complexe I	NADH-quinone oxydoréductase	800	25
Complexe II	Succinate-quinone oxydoréductase	140	4
Complexe III	Ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase	250	9-10
Complexe IV	Cytochrome c oxydase	170	13
Complexe V	ATP synthase	380	12-14

kDa, kilo Dalton.

1.2.1. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative inclut la chaîne de transfert des électrons, le complexe V, l'ANT et le transporteur de phosphate. L'oxydation de différents substrats permet de réduire les coenzymes NAD^+ et FAD respectivement en NADH et FADH_2 ([figure 2](#)). Deux électrons sont récupérés après l'oxydation d'un $\text{NADH} + \text{H}^+$ ou d'un FADH_2 , respectivement au niveau du complexe I et II de la chaîne respiratoire. Ces e^- sont acheminés jusqu'au complexe III par l'intermédiaire de l'ubisemiquinone. Ils sont ensuite transportés jusqu'au complexe IV par le cytochrome c (Cyt c). Au niveau du complexe IV, les électrons s'associent à de l'oxygène (O_2) et deux protons (H^+) pour former une molécule d'eau (H_2O). Les réactions associées au passage des e^- au niveau des complexes I, III et IV, entraînent le passage de H^+ de la matrice vers l'espace inter-membranaire. La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective. Les H^+ vont s'accumuler à l'extérieur de la matrice et établir un gradient électrochimique créant ainsi une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour associer un ADP avec un phosphate inorganique (Pi) pour former de l'ATP ([figure 3](#)).

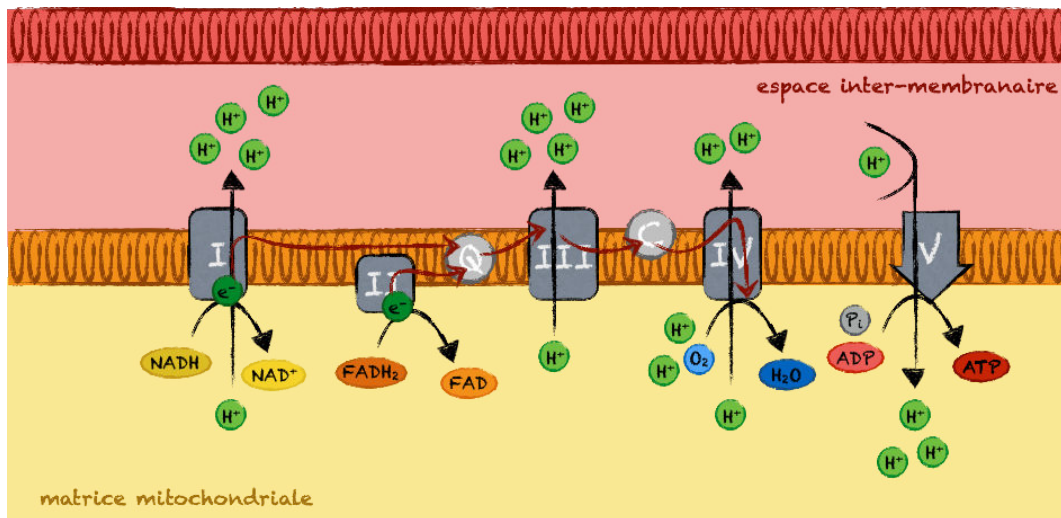


Figure 3. Chaîne de transfert des électrons et complexe V

I, complexe I ; II, complexe II ; Q, coenzyme Q ; III, complexe III ; C, cytochrome C ; IV, complexe IV ; V, complexe V ; NADH, nicotinamide adénine di-nucléotide réduit ; NAD⁺, nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; FADH₂, flavine adénine di-nucléotide réduit ; FAD, flavine adénine di-nucléotide oxydé ; O₂, oxygène ; H₂O, molécule d'eau ; ADP, adénosine di-phosphate ; P_i, phosphate inorganique ; ATP, adénosine-5'-triphosphate ; H⁺, proton ; e⁻, électron.

Le potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) est maintenu entre les deux faces de la membrane interne des mitochondries grâce à la plus haute concentration de H⁺ dans l'espace inter-membranaire. Il est le paramètre bioénergétique central qui contrôle le taux respiratoire, la synthèse d'ATP et la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Il est lui-même contrôlé par le transport d'e⁻ et les fuites de H⁺.

1.2.2. Oxydation des substrats

L'énergie nécessaire à la contraction musculaire est produite par trois métabolismes indépendants (i.e. anaérobie alactique, anaérobie lactique et aérobie). Le métabolisme aérobie, qui nécessite de l'O₂ pour son fonctionnement, a lieu au sein de la mitochondrie. Les substrats suivent différentes voies (pyruvate, acides gras et acides aminés) avant d'être dégradés par le cycle de Krebs ou la bêta-oxydation (β -oxydation) pour fournir des e⁻ à la chaîne respiratoire par le biais des coenzymes NAD et FAD. Des navettes (malate/aspartate et Glycérol-3-Phosphate (G3-P)) contribuent à la fourniture d'e⁻ par le biais d'échanges entre le cytosol et la mitochondrie ([figure 4](#)).

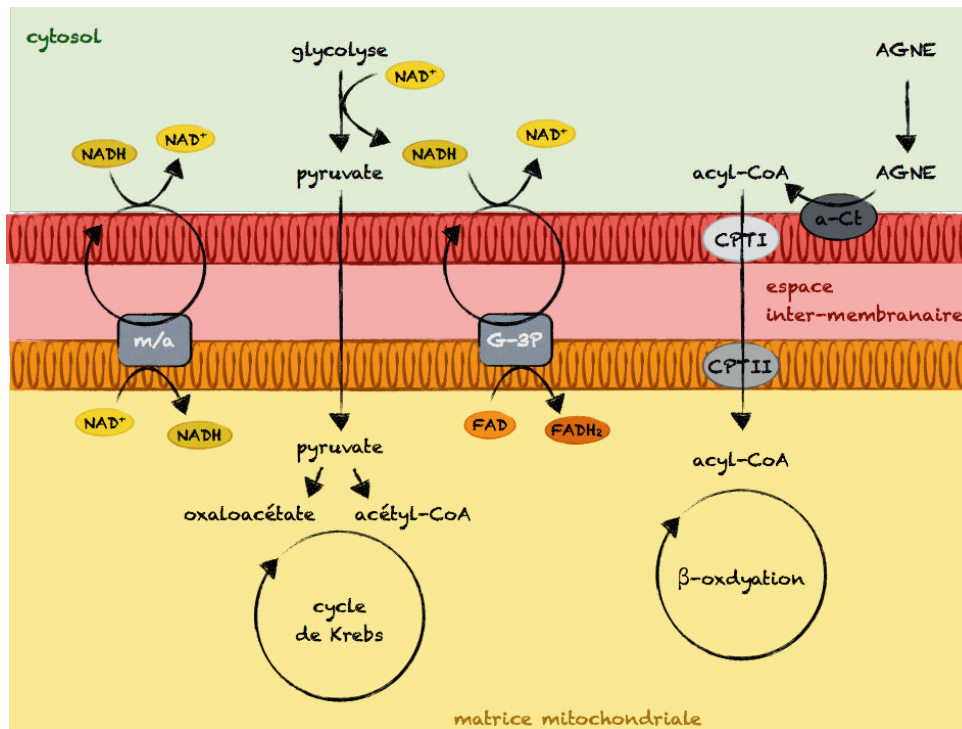


Figure 4. Les différents substrats utilisés par la mitochondrie

NADH, nicotinamide adénine di-nucléotide réduit ; *NAD⁺*, nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; *FADH₂*, flavine adénine di-nucléotide réduit ; *FAD*, flavine adénine di-nucléotide oxydé ; *α-Ct*, l'acetyl-CoA thiokinase ; *CPTI/II*, carnitine palmitoyl-transférase I/II ; *AGNE*, acides gras libres non estérifiés ; *m/a*, navette malate/aspartate ; *G-3P*, navette glycérol-3-phosphate.

1.2.2.1. La voie du pyruvate

Lorsque le pyruvate, issu de la glycolyse, entre dans la mitochondrie, il est soit décarboxylé, par la pyruvate carboxylase, en oxaloacétate (un intermédiaire du cycle de Krebs), soit il subit la décarboxylation oxydative par la pyruvate déshydrogénase (PDH), pour aboutir à la formation d'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs ([figure 4](#)).

Le cycle de Krebs est l'étape finale du catabolisme oxydatif des hydrates de carbone, des acides gras et des acides aminés. Il débute par la formation d'une molécule à 6 carbones, le citrate, à partir de l'association d'une molécule à 2 carbones, l'acétyl-CoA, et d'une molécule à 4 carbones, l'oxaloacétate. Pendant le cycle, l'acétyl-CoA est oxydé en CO_2 et H_2O par une série de huit réactions enzymatiques ([figure 5](#)). Un cycle permet la production de 12 ATP : 1 ATP, 3 $\text{NADH} + \text{H}^+$ et 1 FADH_2 qui donneront, une fois ré-oxydés par la chaîne respiratoire, respectivement 9 et 2 ATP.

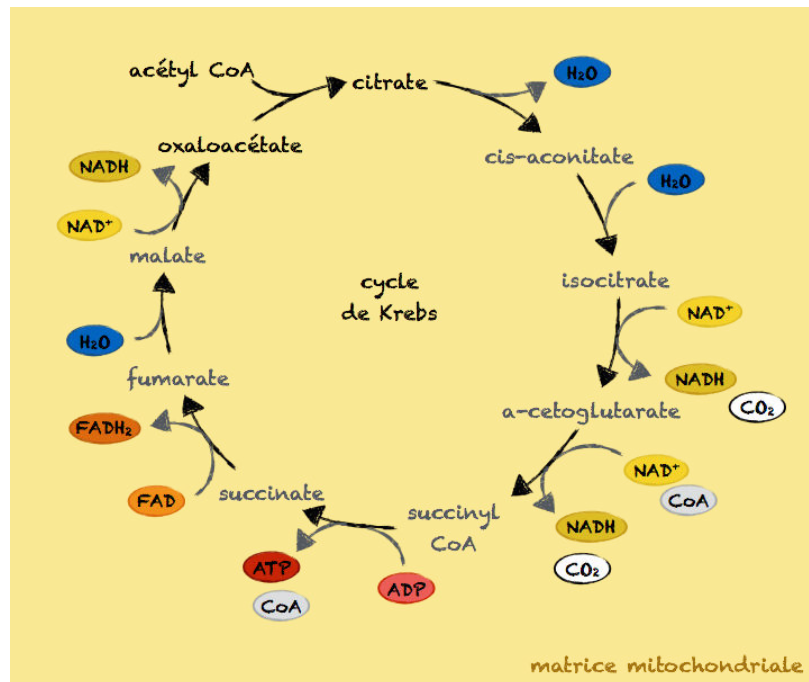


Figure 5. Cycle de Krebs

NAD^+ , nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; $NADH$, nicotinamide adénine di-nucléotide réduit ; oxydé ; FAD , flavine adénine di-nucléotide oxydé ; $FADH_2$, flavine adénine di-nucléotide réduit ; H_2O , molécule d'eau ; ADP , adénosine di-phosphate ; ATP , adénosine-5'-triphosphate ; CO_2 , dioxyde de carbone ; CoA , coenzyme A.

1.2.2.2. La voie des acides gras

Les acides gras libres (ou acides gras non estérifiés, AGNE) sont stockés sous forme de triglycérides dans les adipocytes, le foie et le muscle squelettique. Les AGNE du tissu adipeux sont transportés vers le muscle *via* la circulation sanguine. Ils pénètrent dans le cytosol selon un gradient de concentration et en traversant le sarcolemme grâce à des transporteurs : la FABPpm (Plasma Fatty Acid Binding Protein), la FAT (Fatty Acid Translocase) et la FATP (Fatty Acid Transport Protein). Pour être utilisés par la mitochondrie, les AGNE sont transformés en acyl-coenzyme A (acyl-CoA) par une enzyme présente sur la membrane externe de la mitochondrie, l'acyl-CoA thiokinase.

Un acyl-CoA est un nom générique attribué aux AGNE à longues chaînes associés au coenzyme A (CoA). Il est transformé par la carnitine palmitoyl-transférase I (CPTI) pour pénétrer jusque dans la matrice puis est ensuite retransformé par la CPTII en acyl-CoA pour entrer dans le cycle de la β -oxydation ([figure 4](#)).

La β -oxydation catabolise l'acyl-CoA par la répétition de quatre réactions jusqu'à ce qu'il soit scindé en acétyl-CoA. Chaque cycle aboutit à la production de FADH_2 , $\text{NADH}+\text{H}^+$ et d'un acyl-CoA raccourci de deux carbones (2 acétyl-CoA au dernier tour) ([figure 6](#)). L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de Krebs ([figure 4](#)).

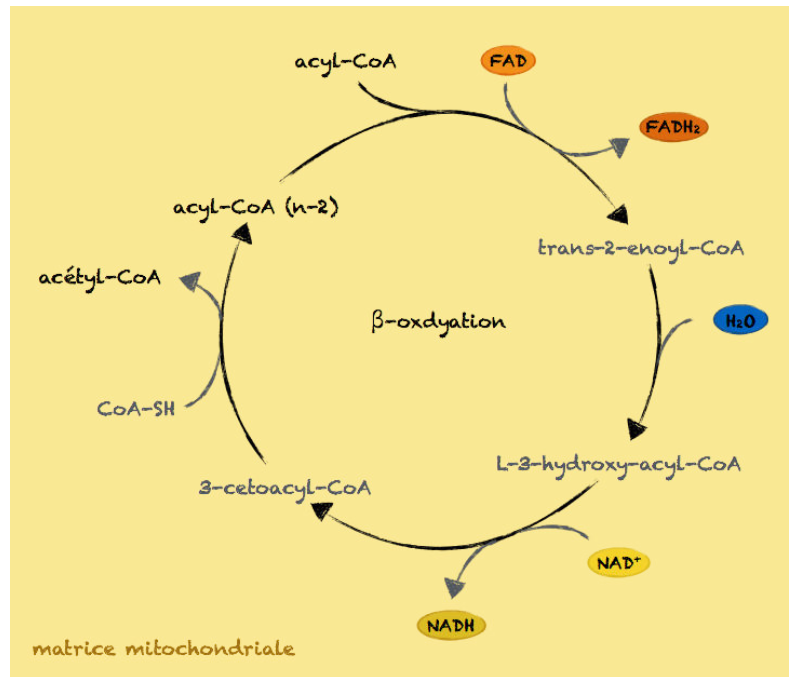


Figure 6. Beta-oxydation

NAD^+ , nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; NADH , nicotinamide adénine di-nucléotide réduit ; oxydé ; FAD , flavine adénine di-nucléotide oxydé ; FADH_2 , flavine adénine di-nucléotide réduit ; H_2O , molécule d'eau.

La classification des acides gras se fonde sur le nombre d'atomes de carbone (compris entre 4 et 36) et sur le nombre de doubles liaisons. On définit alors les acides gras saturés (sans double liaison) et les acides gras mono et polyinsaturés (porteurs d'une ou de plusieurs doubles liaisons). On rencontre différents acides gras comme l'acide palmitique (saturé), oléique (mono) et linoléique (poly). Prenons l'exemple du palmitate, un acide gras saturé contenant 16 carbones. Lorsqu'il est associé au CoA, et forme donc le palmitoyl-CoA, il permet la production d'un total de 131 ATP : 8 acétyl-CoA, 7 NADH et 7 FADH_2 produisant respectivement 96, 21 et 14 ATP. A nombre de carbones équivalents, un acide gras génère plus de molécules d'ATP qu'un ose. Par exemple, le glucose, qui possède 6 carbones, fournit 38 ATP. Cette production, rapportée au nombre de carbones, donne ~ 8 et ~ 6 ATP par carbone respectivement pour le palmitate et le glucose. Cependant, ce rendement nécessite plus

d'oxygène pour synthétiser des liaisons phosphate à partir du palmitate : l'oxydation de 1 mole de glucose utilise 6 moles d'O₂, tandis que 1 mole de palmitate utilise 31 moles d'O₂.

1.2.2.3. La voie des acides aminés

Les acides aminés ne peuvent être stockés dans l'organisme. En cas d'excès, ils sont catabolisés. Ce catabolisme comprend essentiellement la séparation de l'azote du squelette carboné qui sera ensuite utilisé pour la synthèse de glucose et/ou d'acides gras. L'azote sera recyclé par l'organisme ou excrété sous forme d'urée. Le catabolisme des acides aminés les transforme en intermédiaires ou en précurseurs du cycle de Krebs, afin d'être métabolisés ensuite en CO₂ et H₂O ou utilisés dans la gluconéogenèse. Les 20 acides aminés protéiques présentent des squelettes carbonés très différents, si bien que les transformations en intermédiaires du cycle de l'acide citrique suivent des voies différentes. Les acides aminés protéiques sont dégradés en l'un des sept intermédiaires métaboliques suivants : pyruvate, α -cétoglutarate, succinyl-CoA, fumarate, oxaloacétate, acétyl-CoA ou acétoacétate. Ils sont répartis en deux groupes selon leur catabolisme : 1) glucoformateurs : pyruvate, α -cétoglutarate, succinyl-CoA, fumarate et oxaloacétate, et 2) cétogènes : acétyl-CoA et acétoacétate ([figure 7](#)).

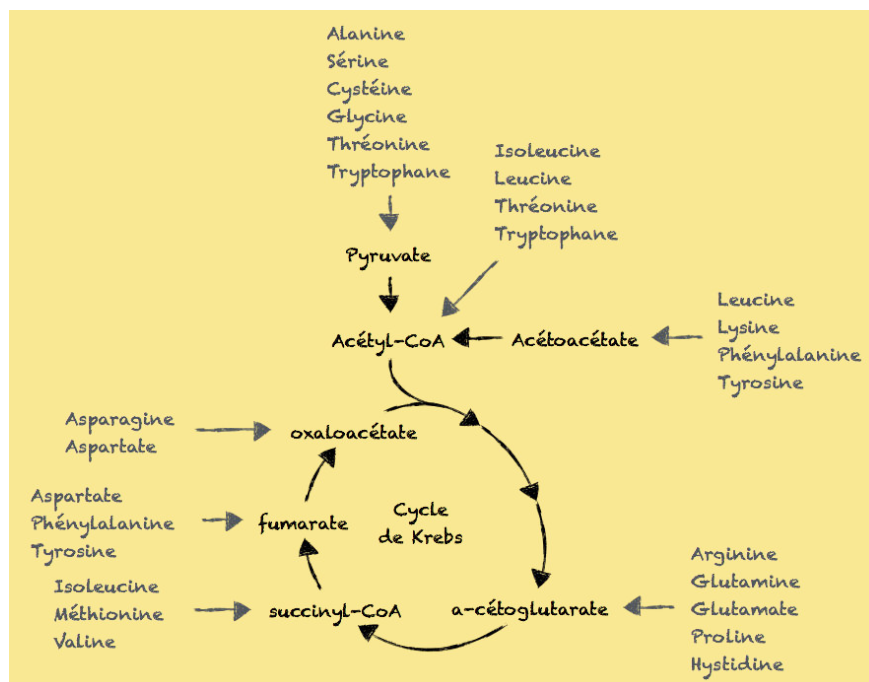


Figure 7. La voie des acides aminés

1.2.2.4. La navette malate/aspartate

La navette malate/aspartate est un mécanisme de transport de molécules, *via* des transformations et échanges. Elle permet d'augmenter le NADH dans la matrice, pour la chaîne respiratoire, et le NAD^+ dans le cytosol, pour la glycolyse ([figure 4](#)). Ces modifications de ratios NAD^+/NADH se font sans qu'aucune molécule de NAD traverse la membrane interne mitochondriale. Le malate entre dans la mitochondrie pour être transformé en oxaloacétate et ainsi réduire le NAD^+ en NADH. Pour retourner dans le cytosol, l'oxaloacétate sera transitoirement transformé en aspartate. Il sera ensuite utilisé pour oxyder le NADH en NAD^+ et reformer du malate. Le passage de malate et d'aspartate à travers la membrane se fait par échange respectif avec un α -cétooglutarate et un glutamate. Ces derniers serviront à la transformation réversible de l'oxaloacétate en aspartate ([figure 8](#)).

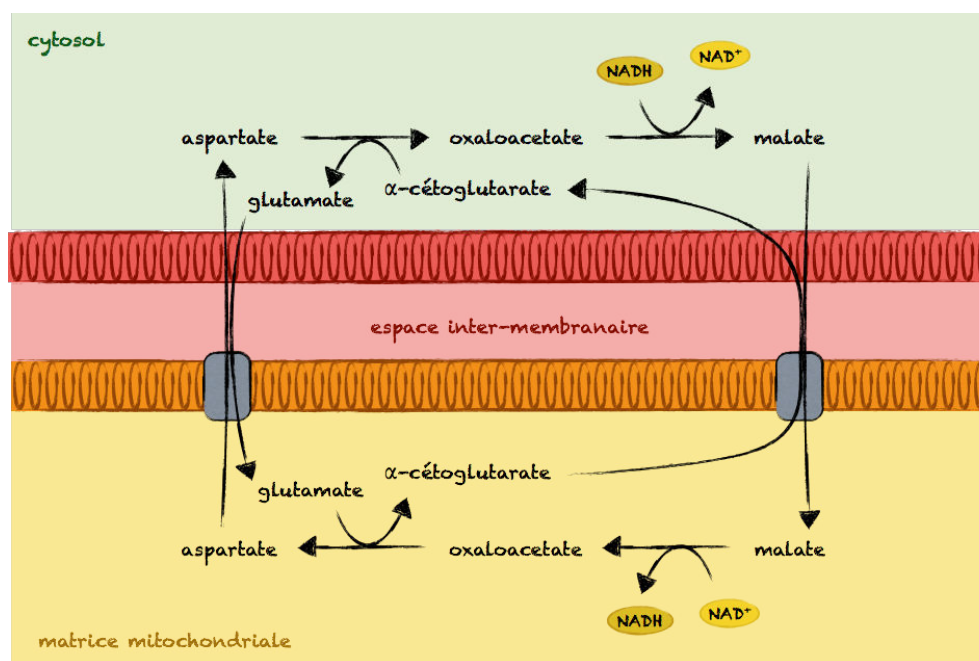


Figure 8. Navette malate/aspartate

NAD^+ , nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; NADH, nicotinamide adénine di-nucléotide réduit.

1.2.2.5. La navette du Glycérol-3-Phosphate

Cette navette permet la régénération cytoplasmique de NAD^+ contre la formation, au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, de FADH_2 qui cèdera ses électrons au coenzyme Q de la chaîne respiratoire. Le G3-P diffuse jusqu'à la membrane interne où la

glycérol phosphate déshydrogénase le transforme en dihydroxyacétone phosphate, en réduisant le FAD^+ en FADH_2 (figure 9). La navette G3-P, en shuntant le cycle de Krebs, asservit la fonction mitochondriale à la glycolyse, permettant ainsi la régénération rapide de NAD^+ (figure 4).

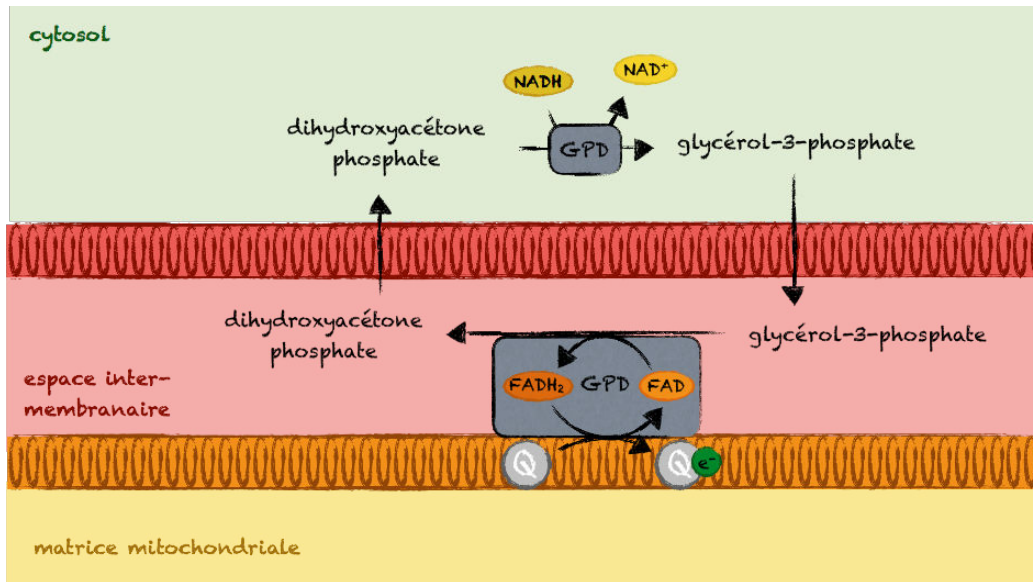


Figure 9. Navette Glycérol-3-Phosphate

NAD^+ , nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé ; NADH , nicotinamide adénine di-nucléotide réduit ; oxydé ; FAD , flavine adénine di-nucléotide oxydé ; FADH_2 , flavine adénine di-nucléotide réduit ; GPD, glycérol phosphate déshydrogénase : II, complexe II.

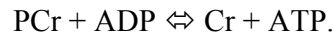
1.3. Transfert d'énergie

La créatine kinase et l'adénylate kinase sont les deux kinases qui permettent au muscle de fournir de l'énergie dès le début l'effort. Ces réactions ne demandent pas d' O_2 et ne produisent pas de lactate : c'est la voie anaérobie alactique. Même si les mitochondries sont connues pour être les usines de la voie aérobie, ces deux kinases de la voie anaérobie alactique se retrouvent dans les mitochondries.

1.3.1. Créatine Kinase

La consommation d'énergie intracellulaire s'effectue principalement au niveau du sarcolemme, du réticulum sarcoplasmique et des myofibrilles, tandis que la production de composés à haute énergie se déroule à l'intérieur des mitochondries ou des complexes

glycolytiques. Le système créatine kinase (CK) permet de catalyser le transfert réversible d'une liaison riche en énergie entre la créatine (Cr) et l'ATP ([figure 10](#)) :



Ce système joue ainsi un rôle capital dans le transfert et la distribution de l'énergie. Dans le muscle squelettique, la phosphocréatine (PCr) est un substrat rapidement mobilisable par la CK pour fournir de l'ATP. En effet, le muscle doit être capable de fournir une quantité d'ATP qui peut s'élever de 100 fois en quelques millisecondes. Dans le muscle oxydatif, le système des CK assure un transfert de l'énergie vers les ATPase et un transfert du signal vers la mitochondrie. Ces transferts, rapides et efficaces, permettent le maintien de rapports ATP/ADP élevés près des sites d'utilisation. On distingue différentes CK : myofibrillaires, du réticulum sarcoplasmique et mitochondriales.

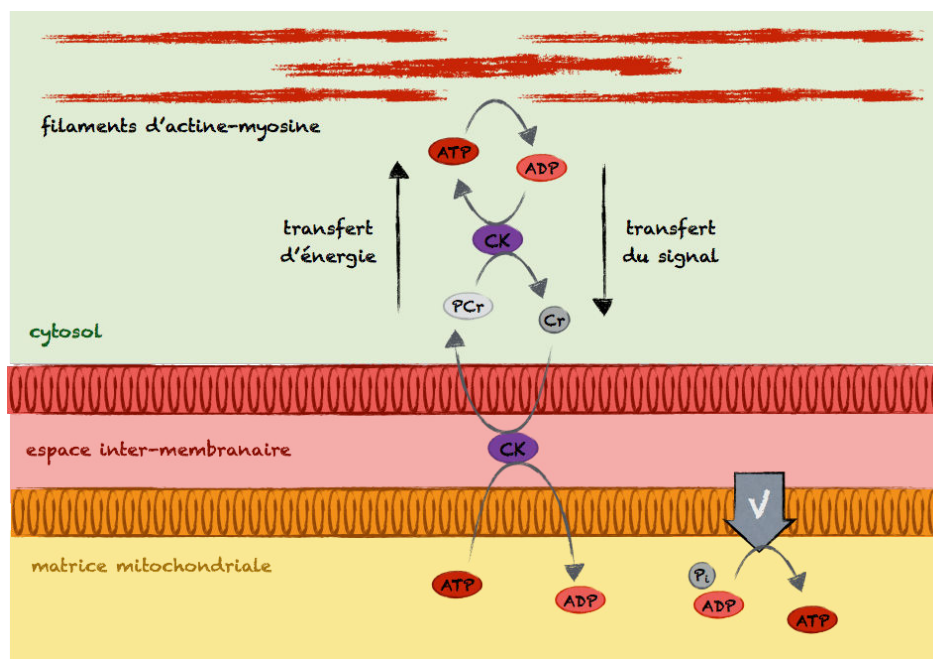


Figure 10. Système créatine Kinase

V, complexe *V* ; *ADP*, adénosine di-phosphate ; *P_i*, phosphate inorganique ; *ATP*, adénosine-5'-triphosphate ; *CK*, créatine kinase ; *PCr*, phosphocréatine ; *Cr*, créatine.

1.3.2. Adénylate Kinase

L'adénylate kinase (AK) est une phosphotransférase abondante qui catalyse l'inter-conversion d'adénines nucléotides et régule ainsi leurs ratios dans les différents compartiments intracellulaires. Elle catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate :



Le substrat préféré de tous les AKs est l'adénosine mono-phosphate (AMP), et leur principal donneur de phosphate est l'ATP. Les AKs diffèrent par leur poids moléculaire, leur distribution tissulaire, leur localisation subcellulaire, leur substrat, la spécificité des donneurs de phosphate et leur cinétique. Neuf iso-enzymes différents de l'AK ont été identifiés et caractérisés jusqu'à présent dans les tissus humains, nommés AK1 à AK9 selon l'ordre de leur découverte. AK2, 3 et 4 sont exprimés dans les mitochondries humaines, mais seuls AK2 et 3 sont exprimés dans le muscle squelettique et présents dans l'espace inter-membranaire et la matrice. AK2 et 3 ne phosphorylent que l'AMP, AK2 peut utiliser tous les nucléosides, tandis que AK3 ne peut utiliser que le GTP et l'ITP (Wilson et al. 1976).

1.4. Apoptose

L'apoptose est un processus de mort programmée qui se manifeste lors de dommages irréparables de l'ADN, lors de la perte de contact cellule-matrice ou cellule-cellule, ou lors de la mise en jeu d'une horloge interne dont le mécanisme moléculaire est encore mal compris. Elle se déclenche selon deux voies : 1) la voie intrinsèque (mort par défaut ou accidentelle) en réponse à un stress accidentel dans laquelle les mitochondries jouent un rôle crucial, et 2) la voie extrinsèque (mort sur commande ou programmée) lorsque le signal vient d'une autre cellule qui émet un peptide tel qu'une interleukine qui déclenche un récepteur membranaire. L'apoptose est considérée comme l'un des mécanismes biologiques le plus fondamental, agissant depuis le développement embryonnaire et intervenant dans les processus homéostatiques de l'adulte.

Les mitochondries jouent un rôle important dans les mécanismes de l'apoptose. Cette dernière est caractérisée par la perméabilisation et/ou la rupture de la membrane mitochondriale externe, ce qui entraîne la sortie de protéines mitochondriales (Cyt c, AIF,

Smac/Diablo, endonucléase G) dans le cytoplasme. La translocation de ces protéines induit alors des réactions cataboliques qui déclenchent l'apoptose. Dans ce processus, la fuite des protéines s'effectue par un pore nouvellement créé dans la membrane mitochondriale externe, le pore de transition de perméabilité (PTP), qui comprend, parmi d'autres protéines, le canal anionique Voltage-Dependent Anion-selective Channel (VDAC). Le Cyt c, ainsi relargué dans le cytoplasme, participe à l'assemblage d'un complexe protéique (apoptosome), responsable de l'activation de protéases, enzymes protéolytiques appelées caspases. Les caspases détruisent d'importants composants moléculaires du noyau et du cytoplasme, ce qui conduit à la mort de la cellule ([figure 11](#)). Cette cellule sera phagocytée par des macrophages ou par des cellules voisines, sans laisser de traces, évitant ainsi le déclenchement de la réponse inflammatoire contrairement à la nécrose cellulaire. D'autres protéines sont également relarguées par le PTP et participent à l'apoptose : soit en activant la voie des caspases, ce qui est le cas de Smac/Diablo qui supprime l'effet inhibiteur d'IAP (inhibiteur d'apoptose de protéines) (Matsuyama and Reed 2000), soit par des voies caspases indépendantes, ce qui est par exemple le cas d'AIF qui interagit directement avec l'ADN nucléaire.

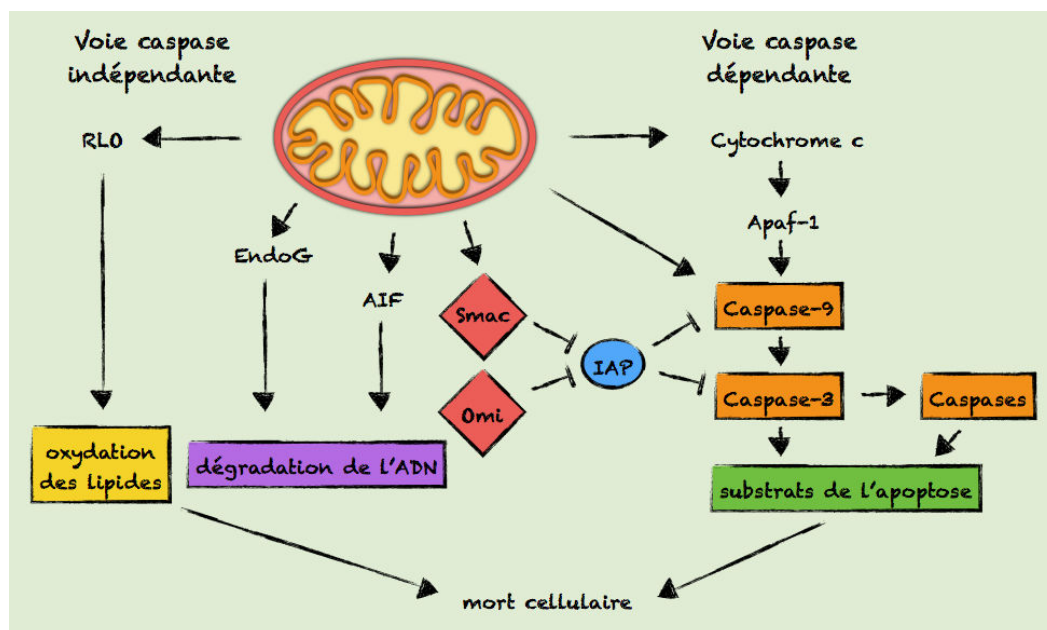


Figure 11. Voies de l'apoptose dépendantes et indépendantes des caspases, inspiré de Jin et al. (2002)

AIF, apoptosis-inducing factor ; Apaf-1, apoptotic protease-activating factor-1 ; EndoG, endonucléase G ; IAP, inhibitor of apoptosis ; RLO, radicaux libres oxygénés ; Smac, second mitochondria-derived activator of caspase.

1.5. Spécificité

1.5.1. Sous-populations mitochondriales

Le muscle squelettique contient deux sous-populations distinctes de mitochondries, les subsarcolemmales (SS) et intermyofibrillaires (IMF), situées respectivement sous le sarcolemme et entre les myofibrilles ([figure 12](#)). Dans le muscle squelettique humain, les mitochondries SS représentent 25% de la totalité des mitochondries. Elles se présentent sous forme de groupements et sont 2 à 3 fois plus condensées que les mitochondries IMF (Elander et al. 1985). Les caractéristiques des mitochondries varient avec la typologie musculaire. En accord avec le muscle humain, les fibres musculaires rapides de rat présentent un contenu protéique pour les mitochondries IMF 20% supérieur aux mitochondries SS (Chabi et al. 2008). Dans les fibres lentes oxydatives, le rapport est inversé : les mitochondries SS ont une densité 4 fois plus importante que les mitochondries IMF (Philippi and Sillau 1994).

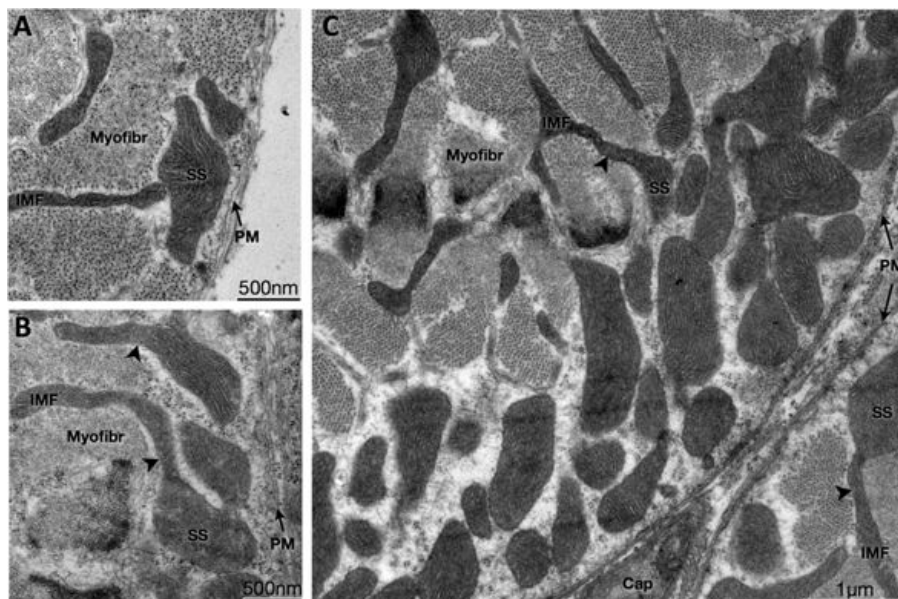


Figure 12. Mitochondries subsarcolemmales et inter-fibrillaires vues au microscope (Picard et al 2013)

Microscopie électronique en transmission de myofibrilles dans le plan transversal. A : les mitochondries SS et IMF sont des organelles distinctes. B et C : quelques mitochondries SS et IMF formant des organismes continues (pointes de flèches) qui coexistent dans les deux compartiments sous-cellulaires. SS, sous-sarcolemmal ; IMF, intermyofibrillaire ; PM, membrane plasmatique (sarcolemme) ; Myofibr, myofibrilles ; Cap, capillaire.

Les mitochondries IMF présentent une capacité respiratoire (Krieger et al. 1980; Elander et al. 1985; Philippi and Sillau 1994; Servais 2003; Chabi et al. 2008), une activité enzymatique (Krieger et al. 1980; Philippi and Sillau 1994; Chabi et al. 2008) et un contenu en protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (Ferreira et al. 2010) supérieurs à ceux des mitochondries SS. Ainsi, les mitochondries IMF ont été présentées comme ayant pour but principal de soutenir en énergie la machinerie contractile, et les mitochondries SS comme fournissant de l'énergie pour les processus de transport avec la membrane sarcolemmale. Néanmoins, il a été montré que les mitochondries IMF possédaient un potentiel membranaire inférieur aux mitochondries SS (Chabi et al. 2008); un élément ne jouant pas en leur faveur dans la production d'ATP.

D'autres différences sont à noter entre ces deux populations, comme la production de radicaux libres (Servais 2003; Adhihetty et al. 2005) et un seuil d'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) induite par un stress calcique (Adhihetty et al. 2005) plus élevé chez les mitochondries SS.

1.5.2. Typologie musculaire

L'analyse d'échantillons musculaires de *vastus lateralis* chez l'homme révèle que les fibres de type I ont une densité mitochondriale respectivement ~1,4 et ~2,7 fois supérieure aux fibres de type IIA et IIB (Howald et al. 1985). La différence de capacité oxydative entre les fibres lentes oxydatives et les fibres rapides glycolytiques (Anderson and Neufer 2006) pourrait s'expliquer par la différence de densité mitochondriale entre ces deux types de fibres. Cependant plusieurs résultats laissent penser que les mitochondries suivent une spécialisation en fonction du type de fibre.

En effet, les mitochondries des muscles lents ont montré une utilisation supérieure de la navette malate/aspartate et inférieure de la navette G3-P comparativement aux mitochondries des fibres rapides. Ces dernières avaient une utilisation préférentielle du pyruvate comparativement aux acides gras (Jackman and Willis 1996; Ponsot et al. 2005; Mogensen and Sahlin 2005). Ces différences pourrait être due à une meilleure activité des enzymes de la β -oxydation, comme l'hydroxyl-CoA déshydrogénase (Jackman and Willis 1996; Mogensen and Sahlin 2005), et du transporteur CPTII (Ponsot et al. 2005) des mitochondries des fibres lentes. Celles-ci affichent un K_m (constante Michaelis-Menten), pour l'ADP exogène,

supérieur aux mitochondries des muscles glycolytiques à contraction rapide (Kuznetsov et al. 1996; Kay et al. 1997). La faible affinité des mitochondries des fibres lentes oxydatives pour l'ADP semble être dû à une faible perméabilité à l'ADP de la membrane mitochondriale externe (Saks et al. 1994; Saks et al. 1995; Kuznetsov et al. 1996; Kay et al. 1997). Comparé aux mitochondries IMF, les mitochondries SS montrent une production de radicaux libres plus importante et un seuil d'ouverture du PTP plus élevé. Pourtant, les fibres lentes, qui contiennent une plus grande proportion de mitochondries SS, produisent moins de radicaux libres (Anderson and Neuffer 2006) et ont un seuil d'ouverture du PTP plus élevé (Picard et al. 2008) que les fibres rapides, ce qui est incompatible avec les propriétés intrinsèques des mitochondries SS par rapport aux mitochondries IMF. Autre élément allant dans le sens de la spécialisation, l'étude sur fibre musculaire unique montre des variations dans l'expression des sous-ensembles protéiques entre les différents types de fibres. Par exemple, les fibres de type I ont des quantités plus élevées d'enzymes responsables de la β -oxydation, et les fibres IIx ont montré une plus grande abondance de protéines associées à la régulation de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et du cycle de Krebs (Murgia et al. 2015).

1.6. Dynamique

La microscopie électronique a montré la mitochondrie comme un objet autonome tandis que la microscopie optique (avec marquage fluorescent) a permis de mettre en évidence le fait que les mitochondries forment un réseau dynamique et continu qui entre continuellement en fusion et en scission. Ce réseau porte le nom de réticulum mitochondrial. Les mitochondries sont ancrées dans la cellule et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que la myosine, la dynéine ou la kinésine. Cette dynamique permet de moduler la population mitochondriale par les mécanismes de fusion et scission.

La fusion et la scission permettent, suite au dysfonctionnement d'une mitochondrie, sa dégradation par autophagie ou de récupérer des fonctions en la remettant en état grâce au partage de matériel ([figure 13](#)).

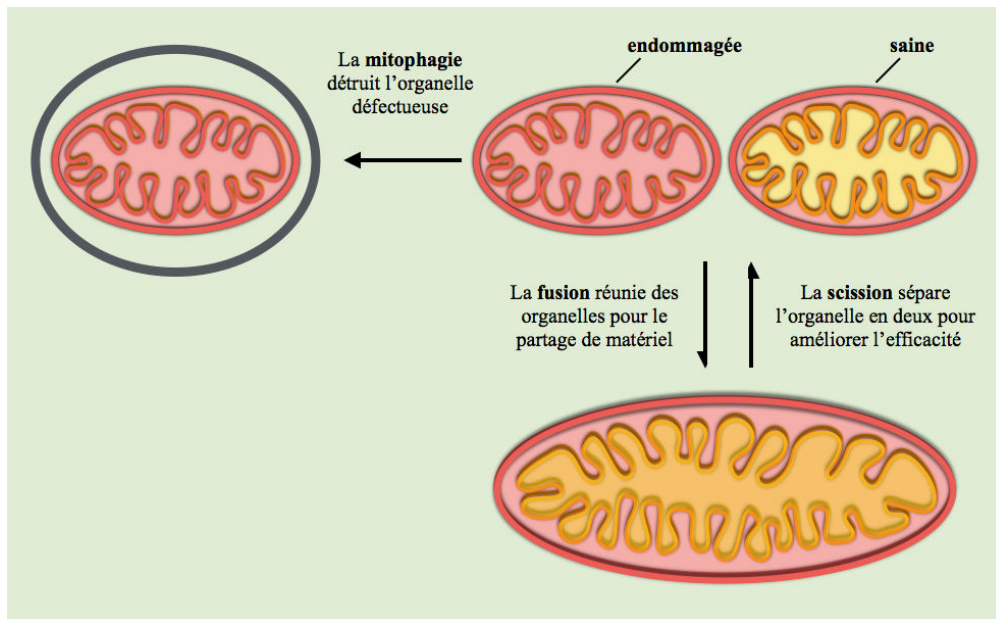


Figure 13. Fusion et scission mitochondriale

Chez les mammifères, la scission est médiée par Drp1, un membre de la famille cytoplasmique des dynamines. Il est recruté dans le cytosol pour former des spirales autour des mitochondries et les comprimer pour couper les deux membranes (interne et externe). Mid49, Mid51, Mff et Fis1 recrutent Drp1 sur les sites de scission mitochondriale (Elgass et al. 2013), souvent sur des sites où les mitochondries prennent contact avec le réticulum endoplasmique (Cheong et al. 2011).

La fusion mitochondriale implique le mélange des deux matrices, indiquant que les deux membranes externes et internes doivent fusionner de façon coordonnée. Cette coordination est un exploit remarquable compte tenu de la géométrie complexe de la membrane interne. La fusion entre les membranes mitochondriales externes est médiée par les membres de la famille dynamine ancrés à la membrane nommés Mfn1 et Mfn2, alors que la fusion entre les membranes mitochondriales internes est médiée par un membre de la famille des dynamines unique appelé Opa1.

Les machineries de la scission et de la fusion mitochondriale sont réglementées par la protéolyse et les modifications post-traductionnelles (Hoppins et al. 2007). Un taux élevé de protéines de fusion mitochondriale telles que Mfn1, Mfn2 et Opa1 est généralement associé à un réticulum mitochondrial en expansion, tandis que l'augmentation des protéines de scission mitochondriale (Drp1, Fis1) conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial (Yu et al.

2006; Lee et al. 2007). L'homéostasie mitochondriale nécessite un équilibre étroitement régulé par les événements de scission et de fusion. En outre, ces procédés contrôlent non seulement la forme mais également la fonction des mitochondries. Par exemple, une augmentation de la fragmentation des mitochondries dans les cellules C2C12, induite par un excès de palmitate qui augmente l'association de Drp1 avec Fis1, est associée à une augmentation du stress oxydatif, à une perte de production d'ATP et à une sensibilité réduite à l'insuline (Jheng et al. 2012). La dynamique mitochondriale permet aux mitochondries d'interagir les unes avec les autres. Sans une telle dynamique, la population mitochondriale consisterait en des organites autonomes dont la fonction serait déficiente.

2. Biogenèse mitochondriale

Le terme « biogenèse » (genèse de la vie) signifie la création d'un nouvel organisme vivant par un organisme existant. Une mitochondrie dérive toujours d'une mitochondrie mère qui peut se diviser de deux manières différentes : 1) par segmentation, étranglement d'une région de la mitochondrie aboutissant à la fusion des membranes internes, ou 2) par partition, allongement d'une crête mitochondriale qui va diviser la mitochondrie en deux mitochondries filles. Le réticulum mitochondrial subit un remodelage constant (scission et fusion) indispensable à son bon fonctionnement. Le nombre de mitochondries évolue donc constamment. Les chercheurs ont parfois utilisé le terme de « biogenèse mitochondriale », en référence à la formation de nouvelles mitochondries, mais ce terme est aussi couramment utilisé en référence à la génération de nouveaux composants mitochondriaux, grâce au recrutement de nouvelles protéines, créées ou importées dans la mitochondrie. Le terme « biogenèse mitochondriale » étant utilisé de nombreuses façons différentes, cela pose problème quant à l'accord sur les meilleures méthodes pour l'évaluer. La mesure de la densité mitochondriale par le biais de la microscopie électronique en transmission est désignée comme la méthode de référence pour témoigner de la biogenèse mitochondriale (Larsen et al. 2012). Néanmoins, une évolution de la densité mitochondriale résulte de deux paramètres, la production et la dégradation de protéines mitochondriales. C'est pour cela que certains chercheurs proposent la mesure du taux de synthèse des protéines mitochondriales comme référence (Miller and Hamilton 2012). L'existence de ce débat souligne bien que le terme biogenèse mitochondriale ne peut se restreindre à l'évolution du nombre de mitochondries, un élément s'apparentant davantage à la dynamique du réticulum mitochondrial et à l'étude de son fonctionnement. Nous définirons donc, dans ce manuscrit, le terme de biogenèse

mitochondriale par la génération de nouveaux composants mitochondriaux, sans occulter la nécessité d'évaluer le rendement des mitochondries.

Comme nous l'avons vu précédemment, la mitochondrie possède plusieurs exemplaires propres de son ADN, indispensables pour maintenir l'ensemble de ses composants (Wiesner 1992). Chaque mitochondrie peut en contenir de deux à dix exemplaires.

2.1. ADN mitochondrial

Les mitochondries humaines contiennent un ADN génomique circulaire à double brins (ADN mitochondrial, ADNmt) de 16 600 paires de base ([figure 14](#)) (Anderson et al. 1981). Le génome code pour 37 gènes : 2 ARN ribosomiques (ARNr), 22 ARN de transfert (ARNt) (pour les 20 acides aminés standards, plus un gène supplémentaire pour la leucine et la sérine) et 13 protéines (des sous-unités des complexes I, III, IV et V) sur les 90 protéines différentes présentes dans la chaîne respiratoire (Zeviani and Di Donato 2004; Taylor and Turnbull 2005). Les autres composants, environ 1100 protéines, sont encodés dans le noyau par des gènes nucléaires et sont importés dans la mitochondrie via des systèmes d'importation spécialisés (Mokranjac and Neupert 2005; Vafai and Mootha 2012). Le génome mitochondrial n'a pas d'intron. La seule région non-codante du génome contient les éléments de contrôle de la transcription et de la réplication de l'ADN mitochondrial. Les brins individuels des molécules d'ADN mitochondrial sont désignés brin lourd (Heavy, H) et léger (Light, L) en raison de leurs différentes densités. La transcription du brin L est initiée à partir d'un seul promoteur : Light Strand Promotor (LSP, promoteur du brin léger), alors que la transcription du brin lourd est initiée à partir de deux sites spécifiques et différemment réglementés, Heavy Strand Promotor 1 (HSP1, promoteur du brin lourd) et 2 (HSP2) (Montoya et al. 1982).

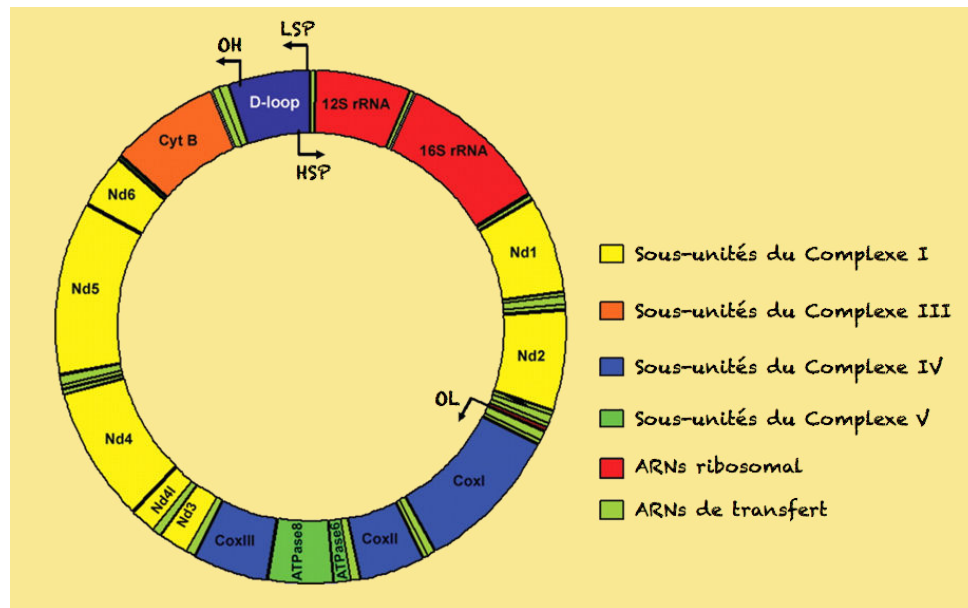


Figure 14. ADN mitochondrial (St John et al. 2010)

LSP, promoteur du brin léger ; HSP, promoteur du brin lourd ; OH, origine de la réplication du brin lourd ; OL, origine de la réplication du brin léger.

2.2. ARN polymérase

L'ARN polymérase (ARNP) est un complexe enzymatique responsable de la synthèse de l'acide ribonucléique (ARN) à partir de l'ADN. L'ARN est une copie de l'ADN. C'est un support intermédiaire des gènes pour synthétiser les protéines. La synthèse d'ARN, un processus qui a lieu dans toutes les cellules, s'appelle la transcription. Chez les eucaryotes, il existe essentiellement trois ARNP (I, II et III) assurant la synthèse des quatre types d'ARN : l'ARNr, l'ARN messager (ARNm), l'ARNt, et les petits ARN. L'existence d'une seule sous-unité d'ARNP dans les mitochondries a été rapportée pour la première fois dans la levure (Greenleaf et al. 1986; Kelly and Lehman 1986), et plus tard dans les cellules humaines (Tiranti et al. 1997). L'ARNP mitochondrial (ARNPmt), qui transcrit l'ADNmt, est codée dans l'ADN nucléaire. Après sa synthèse dans le cytosol, l'enzyme est importée dans la matrice mitochondriale grâce aux translocases membranaires. L'ARNPmt a besoin des facteurs de transcription mitochondriaux, Mitochondrial transcription factor A (Tfam) et Mitochondrial transcription factor B (TFBM), pour sa liaison et sa fusion avec le promoteur de l'ADN (Gaspari et al. 2004; Litonin et al. 2010). Tfam est une protéine abondante qui plie et lie le promoteur de l'ADN en amont du site de début de transcription, et stimule le recrutement de l'ARNPmt et de TFBM au promoteur (Dairaghi et al. 1995; Ekstrand et al.

2004). TFBM aide l'ARNPmt à fusionner avec le promoteur et atteint le site actif de l'ARNPmt pour interagir avec la première paire de l'ARN-ADN hybride (Sologub et al. 2009). Chaque brin est transcrit intégralement. Les longs transcrits primaires subissent ensuite une maturation en ARNm, ARNr et ARNt mitochondriaux.

2.3. Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription (Transcription Factor, TF) sont des protéines qui régulent la copie des gènes en se fixant directement sur l'ADN au niveau des régions promotrices. Dans le cas où ils activent la transcription, leur présence permet l'accès à la machinerie de réplication, comme nous l'avons vu avec Tfam et TFBM. La transcription mitochondriale est réalisée par un petit nombre de facteurs de transcription codés dans le noyau : Tfam, TFB1M et TFB2M.

2.3.1. Tfam et les TFBMs

La transcription de l'ADN mitochondrial se déroule de manière bidirectionnelle à partir de promoteurs divergents, LSP et HSPs, dans sa région de régulation « D-loop ». Les promoteurs au sein de la D-loop contiennent des régions activatrices en amont, liés par Tfam (anciennement appelé mtTF-1 puis mtTFA) à la suite de sa translocation dans la matrice mitochondriale (Fisher and Clayton 1988; Parisi and Clayton 1991). La liaison de Tfam détend, plie l'ADN mitochondrial (Fisher et al. 1992), permet la liaison de l'ARNPmt et l'initiation de la transcription, avec l'aide de l'un des deux TFBMs, TFB1M ou TFB2M.

Deux isoformes d'un facteur de transcription humain spécifique à la mitochondrie, appelées TFB1M et TFB2M (également connu comme h-mtTFB), ont été identifiés (McCulloch et al. 2002; Falkenberg et al. 2002). Bien que TFB1M ait environ 1/10ème de l'activité transcriptionnelle de TFB2M, les deux protéines collaborent ensemble avec Tfam et l'ARNPmt pour diriger correctement l'initiation de HSP et LSP. La zone de contact entre TFB1M et Tfam (domaine carboxy-terminal de Tfam) est essentielle pour l'activation de la transcription et correspond à un domaine qui a été précédemment identifié comme étant un domaine d'activation de Tfam (McCulloch and Shadel 2003).

Le recrutement des facteurs de transcription est indispensable, et chaque type de site régulateur ne peut lier que des TFs apparentés. Les gènes possèdent des séquences régulatrices individuelles qui peuvent comporter des similitudes. L'activité des TFs est régulée par leur interaction avec des kinases. Le fait que les TFs puissent être liés à une multitude de protéines étend le répertoire de signaux influençant l'expression des gènes. Les facteurs de transcription nucléaires NRF-1 et NRF-2 servent à l'induction de la transcription de la majorité des protéines mitochondriales codées dans le noyau, importées par la suite dans la mitochondrie. Le fait qu'ils soient aussi impliqués dans la transcription des facteurs de transcription mitochondriaux les désigne comme médiateurs entre la transcription nucléaire et la transcription mitochondriale.

2.3.2. NRFs

L'identification des facteurs de transcription nucléaires, responsables de l'expression de la partie de l'appareil respiratoire codée dans le noyau, a commencé par l'isolement et la caractérisation du gène Cyt c. NRF-1 et NRF-2 ont été initialement identifiés comme activateurs respectifs du gène du Cyt c (Evans and Scarpulla 1989) et du complexe IV (Virbasius et al. 1993b). Par la suite, des sites de liaison NRF-1 et NRF-2 fonctionnels ont été trouvés dans un certain nombre de gènes qui contribuent à la chaîne respiratoire (Evans and Scarpulla 1990; Chau et al. 1992). Bien que beaucoup de ces gènes codaient pour les sous-unités des cinq complexes respiratoires, certains étaient impliqués dans l'assemblage de l'appareil respiratoire. Des sites de liaisons NRFs ont aussi été trouvés sur des gènes impliqués dans la constitution de la machine de réplication de l'ADN mitochondrial (ARNPmt) et des composants de l'importation de protéines dans la mitochondrie (Virbasius et al. 1993a). Les gènes codant pour trois des quatre sous-unités du Complexe II humain possèdent sur leurs promoteurs des sites à la fois pour NRF-1 et NRF-2 (Au and Scheffler 1998; Elbehti-Green et al. 1998; Hirawake et al. 1999), suggérant que ces deux facteurs nucléaires peuvent coopérer pour l'induction de certaines protéines.

Tfam est un facteur de transcription mitochondriale requis pour la reconnaissance précise et efficace du promoteur de l'ADN mitochondrial par l'ARNPmt (Clayton 1992; Shadel and Clayton 1993). Le promoteur de son gène possède un site de liaison avec NRF-1 et NRF-2. Dans différentes lignées cellulaires, l'activation de ce promoteur a été complètement abolie avec la mutation du site de liaison NRF-1 et réduite avec la mutation du

site NRF-2 (Virbasius and Scarpulla 1994; Wu et al. 1999). De plus, NRF-1 agit sur les gènes humains codant TFB1M et TFB2M (Cam et al. 2004; Gleyzer et al. 2005), deux autres facteurs de transcription mitochondriaux indispensables.

Tous ces éléments fournissent des pistes quant à la médiation effectuée par les NRFs dans la coordination entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial. Cette coordination est donc effectuée par le contrôle direct de l'expression de plusieurs protéines de la chaîne de transport des électrons encodés dans le noyau, et par la régulation indirecte des gènes mitochondriaux présents sur l'ADN mitochondrial, par l'intermédiaire de Tfam et TFBM1/2 ([figure 15](#)).

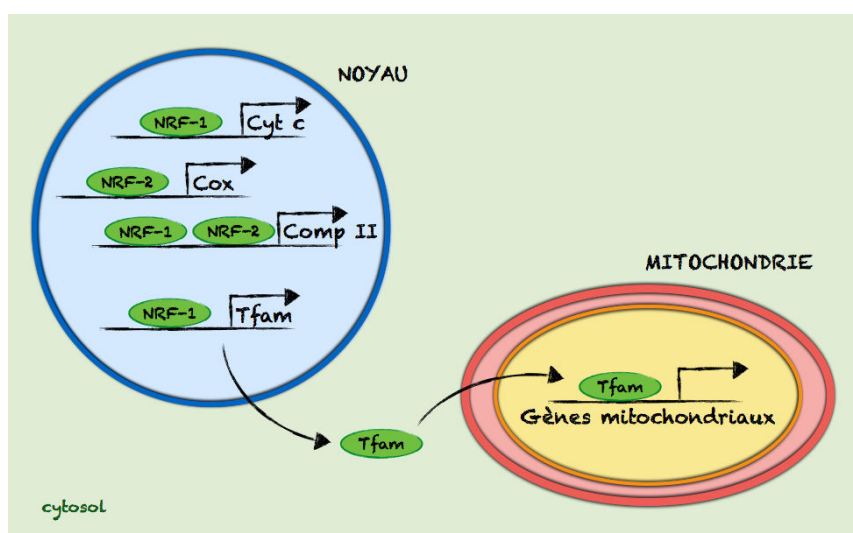


Figure 15. Implication des NRFs dans la transcription des gènes mitochondriaux
NRF-1/2, facteur de transcription nucléaire 1/2 ; Tfam, mitochondrial transcription factor A ; Cyt c, cytochrome c ; Cox, cytochrome oxydase ; Comp II, complexe II.

2.4. Cofacteurs de transcription

Les facteurs de transcription fonctionnent grâce à l'accueil de protéines co-activatrices ou de co-répresseurs spécifiques. Bien que les facteurs de transcription se lient à l'ADN d'une manière spécifique à la séquence, ils manquent généralement des activités enzymatiques nécessaires pour modifier la chromatine, détendre l'ADN et recruter l'ARN polymérase II. Ces activités biochimiques sont le travail de co-régulateurs, qui existent généralement sous forme de complexes multi-protéiques dans le noyau, et peuvent être recrutés pour interagir avec des facteurs de transcription en réponse à des signaux cellulaires.

2.4.1. HDACs

La compaction de l'ADN, lorsqu'il est enroulé autour des histones, le rend inaccessible aux facteurs de transcription. L'association spatiale entre l'ADN génomique et les protéines histones au sein de la chromatine joue un rôle clé dans la régulation de l'expression génique. Elle est largement régie par des modifications post-traductionnelles des histones, incluant la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. Tandis que certaines sont associées à une répression de la transcription, l'acétylation des résidus de lysine au sein des histones est généralement corrélée avec l'activation de la transcription (Li et al. 2007). La dé-acétylation des histones par des enzymes, les Histones déacétylases (HDACs), va engendrer la compaction de l'ADN et rendre la transcription inaccessible. Les HDACs forment des complexes multi-protéines et peuvent être divisées en trois classes : classe I (HDACs 1, 2, 3, 8 et 11), classe II (a : HDACs 4, 5, 7 et 9 ; b : 6 et 10) et classe III (sirtuines). La navette nucléo-cytoplasmique a été proposée comme un mécanisme fondamental de la régulation de la fonction de la classe IIa des HDACs (McKinsey et al. 2000a). Plusieurs protéines peuvent phosphoryler les HDACs (Backs 2006; McGee et al. 2008). La phosphorylation d'HDAC crée des sites d'amarrage pour la protéine chaperonne 14-3-3 (van Hemert et al. 2001) qui l'escorte vers le cytoplasme (Grozinger and Schreiber 2000), supprimant ainsi l'activité répressive d'HDAC sur les facteurs de transcription se liant à l'ADN (Miska et al. 1999; Wang et al. 1999) ([figure 16](#)).

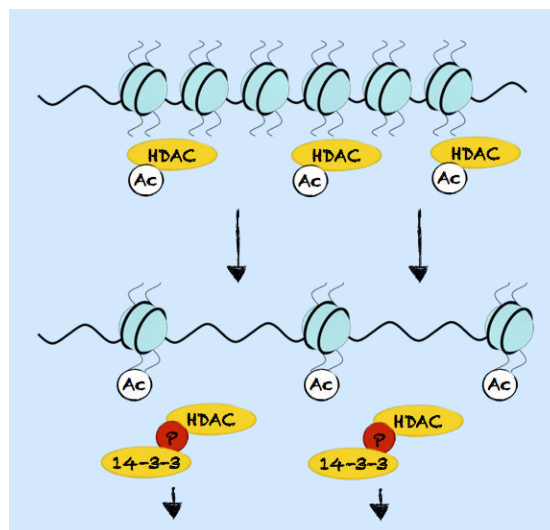


Figure 16. Dé-acétylation des histones par les HDACs, représentation schématique réalisée à partir de Pons et al. (2009)

HDAC, histone déacétylase; 14-3-3, protéine chaperonne ; Ac, groupement acétyle.

2.4.2. SIRTs

Les sirtuines (SIRTs, Silent information regulators) peuvent agir comme des capteurs métaboliques pour moduler la fonction mitochondriale, en utilisant des métabolites intracellulaires, tels que le NAD et l'acétyl-CoA. Ils agissent dans différents compartiments cellulaires : ils désacétylent les histones et plusieurs régulateurs de transcription dans le noyau, mais aussi d'autres protéines spécifiques dans des compartiments cellulaires comme le cytoplasme et les mitochondries. Chez les mammifères, sept membres de la famille des sirtuines existent, de SIRT1 à SIRT7.

SIRT1, SIRT6 et SIRT7 sont présents dans le noyau. Cependant, SIRT1 a également été localisée dans d'autres compartiments cellulaires tel que le cytosol (Sugino et al. 2010) ou la mitochondrie (Aquilano et al. 2010). SIRT2, à l'inverse, est principalement cytosolique et peut être trouvée dans le noyau (North and Verdin 2007). SIRT3, SIRT4 et SIRT5 semblent résider exclusivement dans les mitochondries.

Haigis et Guarente (2006) ont démontré le rôle de SIRT1, SIRT3 et SIRT4 dans le métabolisme mitochondrial. SIRT1 désacétyle le co-activateur-1alpha du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha), ce qui a pour effet de l'activer. SIRT3 se situe en aval de PGC-1 α (Brenmoehl and Hoeflich 2013). Il désacétyle l'acétyl-CoA synthétase 2 (ACS2), pour réguler son activité (Hallows et al. 2006; Schwer et al. 2006), ainsi qu'un composant du complexe I de la chaîne de transport des électrons. SIRT3 intervient également dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Ahn et al. 2008). SIRT4 régule négativement la glutamate déshydrogénase (GDH) en transférant un ADP-ribose à partir du NAD (Haigis et al. 2006).

2.4.3. PGC-1 α

2.4.3.1. Découverte

Le muscle squelettique et le tissu brun adipeux sont les deux principaux lieux de la thermogénèse adaptative. Leurs mitochondries contiennent des protéines découplantes (UCP, uncoupling protein) permettant de dissiper l'énergie sous forme de chaleur. L'importance du

récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma) a été mise en évidence dans la formation des tissus adipeux blanc (stockage d'énergie) et brun (dissipation d'énergie). Cependant, les résultats de ces investigations ont suggéré l'existence d'un cofacteur pour l'aider dans cette différenciation de la cellule adypocitaire. Puigserver et *al.* (1998) clonèrent alors une protéine interagissant avec PPAR γ , préférentiellement exprimée dans le tissu adipeux dissipant de l'énergie, et l'appelèrent PGC-1 α .

2.4.3.2. Implication dans la biogenèse mitochondriale

Lors de l'exposition de souris au froid, l'augmentation de l'expression de PGC-1 α , concomitante à celle de plusieurs protéines mitochondriales clefs, a suggéré l'implication de ce cofacteur dans la biogenèse mitochondriale (Puigserver et *al.* 1998). Cette hypothèse a été confirmée grâce à une expérience menée sur des cellules C2C12. L'expression ectopique de PGC-1 α , dans ces cellules, a induit la transcription de protéines mitochondriales (Puigserver et *al.* 1998).

2.4.3.2.1. Médiation des deux génomes

Dans les cellules C2C12 (Puigserver et *al.* 1998) et l'animal (Lin et *al.* 2002; Miura et *al.* 2003), l'habileté de PGC-1 α à exprimer des ARN messagers de Cox-II, une protéine mitochondriale encodée dans le génome mitochondrial, a suggéré que ce cofacteur pouvait être impliqué dans la coordination entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire. Comme nous l'avons vu précédemment, les facteurs de transcription NRFs induisent la transcription de Tfam, un facteur de transcription mitochondrial qui est encodé dans le noyau puis importé dans la mitochondrie. C'est en fait dans ce mécanisme de transcription que PGC-1 α coordonne les deux génomes, en augmentant la transcription de NRF-1, NRF-2 et Tfam (Wu et *al.* 1999). Dix ans plus tard, PGC-1 α été localisé dans la mitochondrie où il interagit avec Tfam (Aquilano et *al.* 2010; Safdar et *al.* 2011). La fonction exacte de PGC-1 α à l'intérieur des mitochondries reste à élucider. Néanmoins, il est tentant de spéculer que PGC-1 α est un facteur proximal qui coordonne les deux génomes en influant sur les facteurs de transcription des gènes codant pour les mitochondries dans le noyau et la mitochondrie. De cette façon, PGC1- α pourrait fournir un contrôle unifié sur le métabolisme mitochondrial.

2.4.3.2.2. **Fonctionnement de la mitochondrie**

Bien qu'une expression supérieure de PGC-1 α stimulait la biogenèse mitochondriale, le rôle du PGC-1 α endogène dans la biogenèse mitochondriale restait à éclaircir. L'ablation du gène PGC-1 α , dans le corps entier, chez la souris a induit une diminution de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le fonctionnement des mitochondries et de leur transcription (Lin et al. 2004; Leone et al. 2005; Leick et al. 2008). Leone et al. (2005) constatent aussi une réduction de la densité mitochondriale dans le muscle soléaire avec des mitochondries plus petites et moins nombreuses. Arany et al. (2005) n'observe pas de changement dans le volume total des mitochondries mais tout de même une expression réduite de gènes nécessaires dans la fonction mitochondriale. Des résultats plus précis ont été apportés sur le muscle squelettique grâce à une ablation de PGC-1 α tissu-spécifique. Ces études ont elles aussi montré une diminution du niveau d'expression génique et une réduction de la densité mitochondriale (Geng et al. 2010; Zechner et al. 2010). Même si Rowe et al. (2012) ont observé une diminution des ARNm de Tfam et de la capacité respiratoire du Complexe I chez les souris Knock-Out (KO, invalidation génétique) comparé aux souris sauvages, les souris KO ne présentaient pas une densité mitochondriale moins importante. Ces résultats plus mitigés peuvent être expliqués par un nombre très limité d'animaux, et des niveaux d'ARNm de PGC-1 α encore visibles chez les souris KO.

L'implication de PGC-1 α dans la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice a aussi été investiguée à l'aide de souris KO. Leick et al. (2008) ont observé une abolition de l'augmentation des ARNm du Cyt c, uniquement dans le muscle *soleus*, après un exercice aigu pour les souris KO. Cependant, après une période d'entraînement, l'augmentation du contenu en protéine Cyt c n'est pas abolie ni diminuée chez ces souris. L'entraînement augmente aussi le contenu en protéine de Cox-I ; une augmentation émoussée chez les souris KO dans le muscle *quadriceps*. Geng et al. (2010) observent, avec une abolition de PGC-1 α ciblée sur le muscle squelettique, une abolition de l'augmentation du contenu en Cyt c et une altération de celui de Cox-IV dans le muscle *plantaris*. Les travaux de Rowe et al. (2012), quant à eux, ne mettent pas en évidence une implication de PGC-1 α . Ces résultats pourraient s'expliquer par les biais cités précédemment et la compensation possible d'autres co-activateurs. Pour conclure, le co-activateur PGC-1 α est impliqué dans la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice mais n'apparaît pas comme l'unique régulateur.

2.4.3.3. Transcription du gène PGC-1 α

L'activité du promoteur du gène PGC-1 α est le principal déterminant du contenu protéique en PGC-1 α . Ce promoteur contient plusieurs sites qui vont être reconnus par différents facteurs de transcription : 1) un site myocyte enhancer factor-2 (MEF-2) qui va accueillir le facteur de transcription MEF-2 (Handschin et al. 2003), et 2) un site cAMP response element (CRE) qui va pouvoir recevoir les facteurs de transcription Activating transcription factor 2 (ATF-2) et cAMP response element-binding protein (CREB) (Herzig et al. 2001). L'augmentation de l'activité du promoteur du gène PGC-1 α va aussi être influencée par PGC-1 α (protéine) elle-même, par le biais d'une interaction de la protéine avec le facteur de transcription MEF-2 (Amat et al. 2009) ([figure 17](#)).

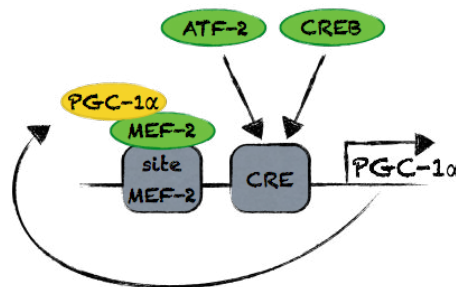


Figure 17. Gène PGC-1 α

Sites de la région promotrice (gris), facteurs (vert) et cofacteur (jaune) de transcriptions. La flèche représente la production de PGC-1 α (protéine) à la suite de l'activation de son gène.

2.4.3.3.1. Site MEF-2

Les membres de la famille des facteurs de transcription MEF-2 jouent un rôle crucial dans la différenciation du muscle squelettique et agissent comme des éléments finaux pour diverses voies de signalisation intracellulaires, dont celles qui contrôlent la myogenèse et l'hypertrophie musculaire (Black et Olson 1998). Les quatre protéines MEF-2, MEF-2A, -B, -C et -D, partagent une homologie dans leur domaine qui médie la liaison à l'ADN, la dimérisation, et les interactions avec d'autres cofacteurs (Black et Olson 1998). Les sites de liaison MEF-2 sont présents dans les régions régulatrices d'une variété de gènes. Différentes voies ont été impliquées dans le contrôle de l'activité de MEF-2, comme celle de p38 et de la signalisation du calcium (Handschin et al. 2003). L'activité de MEF-2 est dépendante des HDACs. L'association de ces derniers à MEF-2 va inhiber son activité. C'est la

phosphorylation des HDACs qui va lever l'inhibition en transportant le co-facteur hors du noyau (Lu et al. 2000; McKinsey et al. 2000b).

2.4.3.3.2. Site CRE

Comme nous l'avons vu précédemment, deux facteurs de transcription peuvent activer le site CRE : ATF-2 et CREB.

Le facteur de transcription ATF-2 (également appelé CRE-BP1) est un membre de la famille des protéines leucine zipper ATF/CREB. Il se lie aux séquences d'ADN régulatrices CRE et AP-1 (Abdel-Hafiz et al. 1992). Diverses formes de stress cellulaire, telles que les agents génotoxiques, les cytokines inflammatoires et l'irradiation aux UV, stimulent l'activité transcriptionnelle d'ATF-2.

CREB est un facteur de transcription ubiquitaire qui est activé en réponse au cAMP ainsi qu'aux signaux calciques (Tan et al. 1996; Sands et Palmer 2008). Lorsque CREB est phosphorylé, il interagit avec l'ARNP à travers sa liaison avec les co-activateurs CREB-binding protein (CBP) et p300 (Chrivia et al. 1993; Kwok et al. 1994; Lundblad et al. 1995). CREB, présents dans le noyau (Scarpulla 1997) mais aussi dans la mitochondrie (De Rasmio et al. 2009) est impliqué dans la modulation de l'expression de gènes codants pour les protéines du système de la phosphorylation oxydative. CREB a été identifié comme pouvant être importé dans la mitochondrie, pour promouvoir la synthèse protéique se déroulant à l'intérieur de celle-ci ; jouant aussi de ce fait le rôle de facteur de transcription mitochondriale (De Rasmio et al. 2009).

2.4.3.4. Activation de la protéine PGC-1 α

La protéine PGC-1 α est localisée principalement dans le noyau. Sa phosphorylation et sa désacétylation sont nécessaires pour l'activer et la concentrer dans le noyau où elle pourra jouer son rôle de co-activateur transcriptionnel (Gerhart-Hines et al. 2007; Anderson et al. 2008). La phosphorylation de PGC-1 α augmente sa durée de vie (Puigserver et al. 2001) et supprime sa liaison avec p160MBP (p160 myb binding protein), un facteur de répression (Fan et al. 2004) ; deux mécanismes décisifs pour son activité. Sa désacétylation est effectuée par SIRT1. Ce dernier est impliqué dans le contrôle de l'expression du gène PGC-1 α par la

stimulation de l'activité de son promoteur, médiée par MEF-2 (Amat et al. 2009). Le contrôle de l'autorégulation de la transcription du gène PGC-1 α semble être un mécanisme essentiel pour conférer la réponse de transcription activée par SIRT1 dans le muscle squelettique (Amat et al. 2009) ([figure 18](#)). La protéine PGC-1 α doit subir sa désacétylation pour être active et ensuite, influencer sur l'activité de MEF-2 qui régule le gène PGC-1 α (Cantó et al. 2009; Cantó et al. 2010). Fait intéressant, des expérimentations sur des cellules HeLa montrent que SIRT1 et PGC-1 α se lient à Tfam à l'intérieur de la mitochondrie (Aquilano et al. 2010), suggérant un mécanisme clef dans la régulation nucléo-mitochondriale de la biogenèse mitochondriale. La méthylation est aussi un mécanisme qui a été identifié dans la régulation de la protéine PGC-1 α (Teyssier et al. 2005).

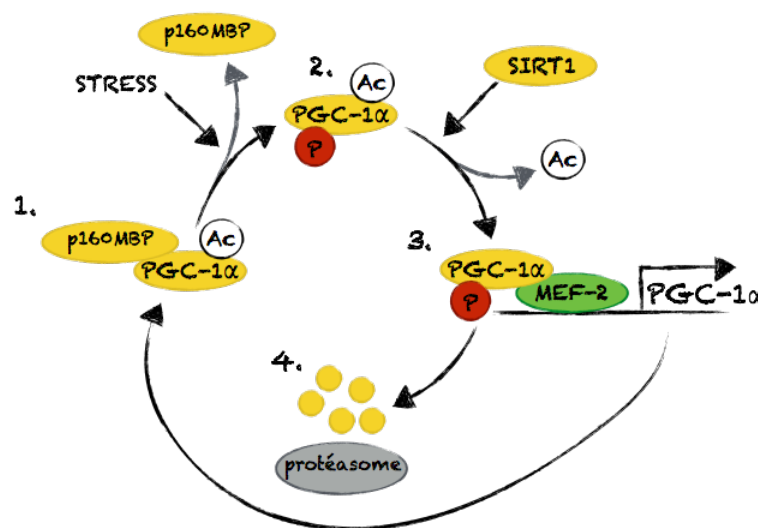


Figure 18. Interaction SIRT-1-PGC1 α

1. La protéine PGC-1 α est acétylée et associée à p160MBP, 2. Suite au stress PGC1 α est phosphorylé et débarrassé de sa protéine répressive p160MBP, 3. SIRT1 déacétyle PGC-1 α qui va contribuer à sa propre transcription par interaction avec MEF-2, 4. Le protéasome détruit la protéine PGC1 α . P160MBP, p160 myb binding protein ; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha ; MEF-2, myocyte enhancer factor-2 ; Ac, groupe acétyle ; P, phosphate ; SIRT1, Silent information regulator 1.

2.5. Les effets de l'entraînement

Dans un premier temps, c'est chez le rat que l'exercice a été mis en évidence comme induisant la biosynthèse de protéines mitochondriales dans le muscle squelettique. Les animaux entraînés sur tapis roulant, pendant 12 semaines, possédaient une quantité totale de protéines mitochondriales ~60% plus élevée que leurs contrôles n'effectuant pas d'exercice (Holloszy 1967). Cette augmentation du matériel mitochondrial s'est accompagnée de différentes améliorations fonctionnelles, comme une meilleure phosphorylation oxydative illustrée par une consommation d'oxygène ~2 fois plus importante pour une même quantité de muscle (Holloszy 1967). Quelques années après, des effets similaires ont été observés chez l'homme, après un mois de pédalage avec une seule jambe à raison de 2 heures par jour à 50-150 watts. Après la période d'entraînement, la jambe effectuant le pédalage possédait un volume mitochondrial 55% supérieur à la jambe contrôle (Morgan 1971). Cette différence a été couplée à une capacité plus élevée du muscle entraîné à oxyder des hydrates de carbones (Morgan 1971). Une dizaine d'années plus tard, ces adaptations ont été confirmées suite à des entraînements de 6 à 8 semaines qui consistaient à pédaler pendant 30 min, 5 fois par semaine, à des intensités supérieures à 85% de la fréquence cardiaque maximale (FCmax). Cette fois-ci, la comparaison a été réalisée sur la même jambe en réalisant un prélèvement musculaire avant et après la période d'entraînement. L'exercice chronique a conduit à une hausse de 40% de la densité mitochondriale (Rösler et al. 1985; Hoppeler et al. 1985). Une étude de Jacobs et al. (1987), utilisant un groupe contrôle qui ne suivait pas l'entraînement, a permis de renforcer la significativité des résultats obtenus avec l'entraînement. Dans cette étude, le groupe qui s'était entraîné 2 à 3 fois par semaine pendant 6 semaines, a eu une augmentation de 12% de l'activité de la Citrate Synthase (CS) au niveau du muscle *vastus lateralis*. Il n'y a pas eu d'évolution du niveau d'activité de la CS pour le groupe non entraîné.

La mesure de l'activité de la CS a été couramment utilisée pour estimer la biogenèse mitochondriale à la suite d'un entraînement. Elle est un des marqueurs les mieux corrélés à la densité mitochondriale. Cette dernière, mesurée par microscopie électronique, est reconnue comme la méthode de référence (Larsen et al. 2012). Des augmentations de 20 à 35% de l'activité de la CS ont été observées à la suite de l'utilisation chronique (1 à 8 semaines) d'exercices continus d'endurance entre 50 et 70% $\dot{V}O_{2max}$ sur des durées de 30min à 2h (Gorostiaga et al. 1991; Chesley et al. 1996; Spina et al. 1996). Ce type d'amélioration n'a pas

uniquement été observé sur des entraînements en endurance mais aussi sur des entraînements de type vitesse. Ces entraînements consistant à répéter 4 à 14 sprints de 15 à 30s entrecoupés de temps de repos allant de 45s à 15min, pendant de 2 à 7 semaines, ont augmenté l'activité de la CS de 12 à 38% (Jacobs et al. 1987; MacDougall et al. 1998; Parra et al. 2000; Rodas et al. 2000). L'entraînement sous forme d'exercices intermittents d'endurance a été étudié de nombreuses fois comme un moyen pour augmenter la densité mitochondriale et la fonctionnalité du réticulum mitochondrial. Par exemple, un entraînement de 3 à 4 jours par semaine pendant 2 à 6 semaines, sous la forme de 10 blocs de 4min à 90% $\dot{V}O_{2max}$ entrecoupés de 2min de repos, a permis d'augmenter de 17 à 28% l'activité de la CS (Talanian et al. 2007; Perry et al. 2008; Gurd et al. 2010; Perry et al. 2010) ; des valeurs similaires à celles énoncées précédemment pour les exercices continus moins intenses et les sprints répétés.

D'autres marqueurs ont été utilisés, tels que le contenu en protéine du complexe IV (Cox) et son activité, ou le taux maximal de production mitochondrial d'ATP. Cette dernière méthode a été utilisée avec des mitochondries isolées ou des fibres perméabilisées, la seconde permettant une meilleure préservation du potentiel oxydatif (Picard et al. 2011). Les mesures de l'activité du complexe IV et de la respiration mitochondriale sont fortement associées. De nos jours, la tendance semble se diriger vers une utilisation de plus en plus importante et régulière de la respiration sur fibres perméabilisées. Cette méthode, même si elle ne renseigne pas directement sur l'augmentation du contenu mitochondrial, permet d'investiguer des adaptations fonctionnelles.

Certaines études se sont aussi intéressées à des marqueurs moins directs de la biogenèse mitochondriale, comme le contenu en protéine de Tfam, NRF et PGC-1 α (Russell et al. 2003; Burgomaster et al. 2008; Gurd et al. 2010; Perry et al. 2010; Serpiello et al. 2012). Ces mesures ont été réalisées dans le but de comprendre les mécanismes de la biogenèse mitochondriale, plutôt que dans l'optique d'évaluer une augmentation de la densité ou de la fonction mitochondriale. Perry et al. (2010) se sont intéressés à ces trois marqueurs dans leur étude au cours de laquelle 9 hommes ont suivi 2 semaines d'entraînement. Les contenus en PGC-1 α et NRF-2 ont augmenté respectivement de 42 et 50%, celui de Tfam restant quant à lui inchangé.

La quasi-totalité des études explorant les effets de l'entraînement sur la biogenèse mitochondriale se sont intéressées à des marqueurs de performance liés à la capacité oxydative. La mesure la plus courante a été celle du $\dot{V}O_{2\max}$ et parfois, un temps limite ou un contre la montre. Ces mesures permettent d'évaluer les effets fonctionnels de l'entraînement mais il est nécessaire d'être prudent sur l'implication de la biogenèse mitochondriale dans des améliorations de performance. Hormis quelques exceptions relevées sur des périodes d'entraînement très courtes et/ou suite à des exercices de sprints (Chesley et al. 1996; Burgomaster et al. 2005; Serpiello et al. 2012), toutes les études ont obtenu une amélioration du $\dot{V}O_{2\max}$ et de la performance (Gibala et al. 2006; Little et al. 2010). Dans ces différentes études, très variées, les sujets effectuaient de 7 à 40 sessions sur 7 jours à 8 semaines avec des augmentations de $\dot{V}O_{2\max}$ allant de 6 à 24%. Par exemple, 40 sessions de 30min >85%FCmax sur 8 semaines (Rösler et al. 1985) et 7 sessions de 10 x 4min à 90% $\dot{V}O_{2pic}$ entrecoupées de 2min de repos sur 13 jours (Talanian et al. 2007), ont induit une augmentation de 13% du $\dot{V}O_{2\max}$. Néanmoins, les différences de populations et de mesures rendent les améliorations difficilement comparables d'une étude à l'autre. Ces améliorations de la condition physique et des marqueurs de la biogenèse mitochondriale retournent **rapidement** aux niveaux initiaux après l'arrêt de l'entraînement (Wibom et al. 1992).

Les effets de nombreux entraînements ont été étudiés afin d'identifier les méthodes les plus efficaces pour induire la biogenèse mitochondriale. Les exercices utilisés étaient très variés, allant d'exercices longs continus de faible intensité à des exercices courts intermittents d'intensité maximale. Des périodes parfois très courtes (7 jours) ont été utilisées, jusqu'à des périodes de 8 semaines. Ces dernières années, les efforts se sont dirigés vers l'identification des caractéristiques déterminantes (fréquence, intensité, etc.) induisant la biogenèse mitochondriale afin de proposer les entraînements les plus pertinents. Le [tableau 2](#) regroupe une quantité non exhaustive d'études faisant état d'une amélioration de différents marqueurs de la biogenèse mitochondriale suite à un entraînement.

Tableau 2. Effets de l'entraînement, sur ergocycle, sur la biogenèse mitochondriale, chez l'homme

Référence	Sujets	Durée	Exercice	Adaptations musculaires	Performance
Morgan (1971)	10 hommes	1 mois chaque jour 30 sessions	(pédalage à une jambe) 2h à 50-150watts	Densité mitochondriale (+55%)	
Rosler et al. (1985)	10 hommes 30ans, 178cm, 70kg $\dot{V}O_{2max} : 52 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	8 semaines 5 jr/semaine 40min	30min à >85%FCmax	Densité mitochondriale (+40%)	$\dot{V}O_{2max}$ (+13% ; 3,66 à 4,14 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)
Hoppeler et al. (1985)	10 sujets (5 h et 5 f) 29ans, 173cm, 64kg $\dot{V}O_{2max} : 43 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	6 semaines 5jr/semaine 30 sessions	30min à >85%FCmax	Densité mitochondriale (+40%)	$\dot{V}O_{2max}$ (+14% ; 43,2 à 49,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), changement de masse corporelle <1%
Jacobs et al. (1987)	11 sujets (7 h et 4 f) 22ans, 163cm, 70kg	6 semaines 2-3x/semaine 15 semaines	(2 à 6 x 15s sprint / 45s repos) + (2 à 6 x 30s sprint / 15min repos)	Activité de la CS (+12%)	
Gorostiaga et al. (1991)	12 sujets (3 h et 9 f) 27ans, 75kg $\dot{V}O_{2max} : 37 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	8 semaines 3jr/semaine 24 sessions	30min à 50%WR _{pic}	Activité de la CS (+25%)	$\dot{V}O_{2max}$ (+11% ; 2,7 à 3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)
Chesley et al. (1996)	8 hommes 22ans, 180cm, 78.6kg $\dot{V}O_{2max} : 45 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	7 jours 3j/1j repos/3j 6 sessions	2h à 65% $\dot{V}O_{2max}$	Activité de la CS (+20%)	$\dot{V}O_{2max}$ non changée
Spina et al. (1996)	12 sujets (6 h et 6 f) 27ans, 74kg $\dot{V}O_{2pic} : 40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	7 jours chaque jour 7 sessions	2h à 60-70% $\dot{V}O_{2pic}$	Activité de la CS (+35%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+9% ; 2,97 à 3,24 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)
Spina et al. (1996)	12 sujets (6 h et 6 f) 27ans, 74kg $\dot{V}O_{2pic} : 40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	10 jours chaque jour 10 sessions	2h à 60-70% $\dot{V}O_{2pic}$	Activité de la CS (+30%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+9% ; 2,97 à 3,24 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)
MacDougall et al. (1998)	12 hommes 22ans, 175cm, 73kg $\dot{V}O_{2max} : 51 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	7 semaines 3jr/semaine 21 sessions	4 à 10 x (30s sprint / 2,5-4min repos)	Activité de la CS (+36%)	$\dot{V}O_{2max}$ (+8% ; 3,73 à 4,01 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)
Starratt et al. (1999)	7 sujets (3 h et 4 f) 20ans, 171cm, 66kg $\dot{V}O_{2pic} : 43 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	10 jours 1x/jr 10 sessions	60min à 75% ou 6 x (5min à 95% $\dot{V}O_{2max}$ / 2-3min à 30-40% $\dot{V}O_{2max}$)	Vmax (+149%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+9% ; 2,83 à 3,09 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)

Référence	Sujets	Durée	Exercice	Adaptations musculaires	Performance
Parra et <i>al.</i> (2000)	10 hommes 24ans, 171cm, 70kg	2 semaines chaque jour 14 sessions	2 à 7 x 30s sprint / 12min	Activité de la CS (+38%)	
Parra et <i>al.</i> (2000)	10 hommes 24ans, 171cm, 70kg	6 semaines 1jr/3 14 sessions	2 à 7 x 30s sprint / 12min	Activité de la CS (+28%)	
Rodas et <i>al.</i> (2000)	5 hommes 21ans, 171cm, 68kg $\dot{V}O_{2max}$: 57 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	2 semaines 1x/jr 14 sessions	(2 à 7 x 15s sprint / 45s repos) + (2 à 7 x 30s sprint / 15min repos)	Activité de la CS (+38%)	$\dot{V}O_{2max}$ (+11% ; 57,3 à 63,8 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
Tonkonogi et <i>al.</i> (2000)	8 sujets (4 h et 4 f) 26ans, 176cm, 70kg $\dot{V}O_{2pic}$: 39 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 4jr/semaine 24 sessions	30min à 70% + (5 x 2min à 100% $\dot{V}O_{2max}$ / 4min à 50% $\dot{V}O_{2max}$)	Vmax (+40%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+24% ; 2,69 à 3,34 l·min ⁻¹)
Walsh et <i>al.</i> (2001)	8 sujets (4 h et 4 f) 26ans, 176cm, 70kg $\dot{V}O_{2pic}$: 38 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 4jr/semaine 24 sessions	30min à 70% + (5 x 4min à 50% $\dot{V}O_{2max}$ / 2min à 100% $\dot{V}O_{2max}$)	Vmax (+38%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+24% ; 2,69 à 3,34 l·min ⁻¹)
Russell et <i>al.</i> (2003)	7 hommes 34ans, 78kg $\dot{V}O_{2max}$: 54 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 3jr/semaine 18 sessions	5-6 x (1-3min à 70-80% $\dot{V}O_{2max}$ / 1min à 50% $\dot{V}O_{2max}$) ou 40min à 60% $\dot{V}O_{2max}$	Contenu en protéine PGC-1 α (+2,8x)	$\dot{V}O_{2max}$ (+10% ; 55,5 à 61,8 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
Burgomaster et <i>al.</i> (2005)	8 sujets (6 h et 2 f) 22ans, 180cm, 84kg $\dot{V}O_{2pic}$: 45 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	2 semaines 1-2 jr de repos 6 sessions	4 à 7 x 30s « all-out » / 4min repos	Activité de la CS (+38%)	$\dot{V}O_{2pic}$ inchangée
Gibala et <i>al.</i> (2006)	8 hommes 22ans, 183cm, 80kg $\dot{V}O_{2pic}$: 50 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	14 jours 1-2 jr de repos 6 sessions	4 à 6 x 30s « all-out » / 4min repos	Activité de Cox (+), Cox-II (+) et -IV (+)	Time trial 750 kJ (+10%)
Gibala et <i>al.</i> (2006)	8 hommes 22ans, 183cm, 80kg $\dot{V}O_{2pic}$: 50 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	14 jours 1-2 jr de repos 6 sessions	90 à 120min à 65% $\dot{V}O_{2pic}$	Activité de Cox (+), contenu en protéine de Cox-II (+) et -IV (+)	Time trial 750 kJ (+8%)
Talanian et <i>al.</i> (2007)	8 femmes 22ans, 65kg $\dot{V}O_{2pic}$: 36 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	13 jours 1j/2 7 sessions	10 x 4min à 90%WR _{pic} / 2min repos	Activité de la CS (+20%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+13% ; 2,36 à 2,66 l·min ⁻¹)

Référence	Sujets	Durée	Exercice	Adaptations musculaires	Performance
Perry et al. (2008)	8 sujets (5 h et 3 f) 24ans, 179cm, 72kg $\dot{V}O_{2pic}$: 45 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 3jr/semaine 18 sessions	10 x 4min à 90%WR _{pic} / 2min repos	Activité de la CS (+26%) et contenu en protéine de Cox-IV (+18%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+9% ; 3,29 à 3,58 l·min ⁻¹)
Daussin et al. (2008)	11 sujets (7 h et 4 f) 45ans, 174cm, 76kg $\dot{V}O_{2max}$ < 30 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	8 semaines 3jr/semaine 24 sessions	4 à 7 x 4min à 56%PMA / 1min à 90%PMA	Vmax (+36%)	$\dot{V}O_{2max}$ (+15%)
Burgomaster et al. (2008)	20 sujets (10 h et 10 f) 24ans, 173cm, 72kg $\dot{V}O_{2pic}$: 41 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 5jr/semaine 30 sessions	4 à 6 fois 30s de sprint	Contenu en protéine de PGC-1α (+2x) et activité de la CS (+)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+7%, 2,9 to 3.1 l·min ⁻¹)
Burgomaster et al. (2008)	20 sujets (10 h et 10 f) 24ans, 173cm, 72kg $\dot{V}O_{2pic}$: 41 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 5jr/semaine 30 sessions	40 à 60min à 65% $\dot{V}O_{2pic}$	Contenu en protéine de PGC-1α (+2x) et activité de la CS (+)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+7%, 2,9 to 3.1 l·min ⁻¹)
Gurd et al. (2010)	9 sujets (6 h et 3 f) 23ans, 178cm, 73kg $\dot{V}O_{2pic}$: 45 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 3jr/semaine 18 sessions	10 x 4min à 90%WR _{pic} / 2min repos	Activité de la CS (+28%), contenu en protéine de PGC-1α (+16%) et Cox-IV (+36%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+11% ; 45 à 49.9 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹), masse corporelle et BMI inchangés
Little et al. (2010)	7 hommes 21ans, 83kg $\dot{V}O_{2pic}$: 46 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	2 semaines 3jr/semaine 6 sessions	8 à 12 x 60s à 100%WR _{pic} / 75s repos	Activité de la CS (+16%) et Cox (+22%) ; contenu en protéine CS (+20%), Cox -II (+35%) -IV (+38%), et Tfam (+37%)	Time trials 2km (50 kJ, +11%) et 30km (750 kJ, +9%)
Perry et al. (2010)	9 hommes 23ans, 179cm, 82kg $\dot{V}O_{2pic}$: 46 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	2 semaines 3jr/semaine 7 sessions	10 x 4min à 90% $\dot{V}O_{2pic}$ / 2 min repos	Contenu en protéine PGC-1α (+23%, +24h; +42%, 5th), NRF-2 (+50%, 5th) et Cox-IV (+20%, 5th) ; activité de la CS (+17%, 3rd)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+12% ; 3,74 à 4,18 l·min ⁻¹)
Serpiello et al. (2012)	9 sujets (7 h et 2 f) 22ans, 174cm, 70kg $\dot{V}O_{2pic}$: 54 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	4 semaines 3jr/semaine 12 sessions	3 blocs de : 5 x 4s sprint / 20s repos, séparées de 4,5 min	Contenu en protéine PGC-1α (+33%)	$\dot{V}O_{2pic}$ inchangée
Cochran et al. (2014)	9 sujets (5 h et 4 f) 22ans, 78kg, 173cm $\dot{V}O_{2pic}$: 47 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	6 semaines 3jr/semaine 18 sessions	4 min « all-out »	Contenu en protéine Cox-IV (+20%)	$\dot{V}O_{2pic}$ (+6%), time trial 250 kJ (+9%)

Abréviations : h, hommes ; f, femmes ; CS, Citrate Synthase ; Vmax, respiration maximale (fibres perméabilisées) ; +, augmentation : kJ, kilojoules.

POINTS CLEFS

- La mitochondrie est le producteur d'énergie aérobie dans le muscle squelettique.
 - La biogenèse mitochondriale est un phénomène complexe aboutissant à l'augmentation de la population mitochondriale. Cela se traduit, d'un point de vue fonctionnel, par une amélioration de la capacité aérobie.
 - L'exercice physique est un puissant stimulateur de la biogenèse mitochondriale qui va engendrer une amélioration de la condition physique.
 - L'activité physique va induire différents stimuli qui vont activer des facteurs et cofacteurs de transcription. En se fixant sur l'ADN, ces derniers vont recruter la machinerie de réplication qui copiera l'ADN pour former de nouvelles protéines mitochondriales.
-

3. Couplage excitation-transcription

Comme abordé dans la partie précédente, l'exercice est un puissant stimulus pour la biogenèse mitochondriale. L'activité contractile lors de l'exercice en endurance engendre des stimuli biochimiques et biophysiques localisés dans le muscle qui se contracte. Ces perturbations de l'homéostasie du muscle squelettique entraînent l'activation de cascades de signalisation comprenant des protéines kinases, des phosphatases, des déacétylases, des co-régulateurs transcriptionnels et des facteurs de transcription ([figure 19](#)). Ces événements se produisent d'une manière temporelle. Par exemple, l'activation des kinases et la régulation pré-transcriptionnelle se produit pendant l'exercice et la récupération, alors que la transcription se réalise par la suite. L'ampleur de l'activation et la contribution des différentes voies de signalisation dépendent de l'intensité, de la durée, du mode d'exercice, ainsi que des variables environnementales. Dans cette partie, nous allons présenter les principales voies de signalisations influencées par l'activité contractile, puis l'influence des caractéristiques de l'exercice sur celles-ci.

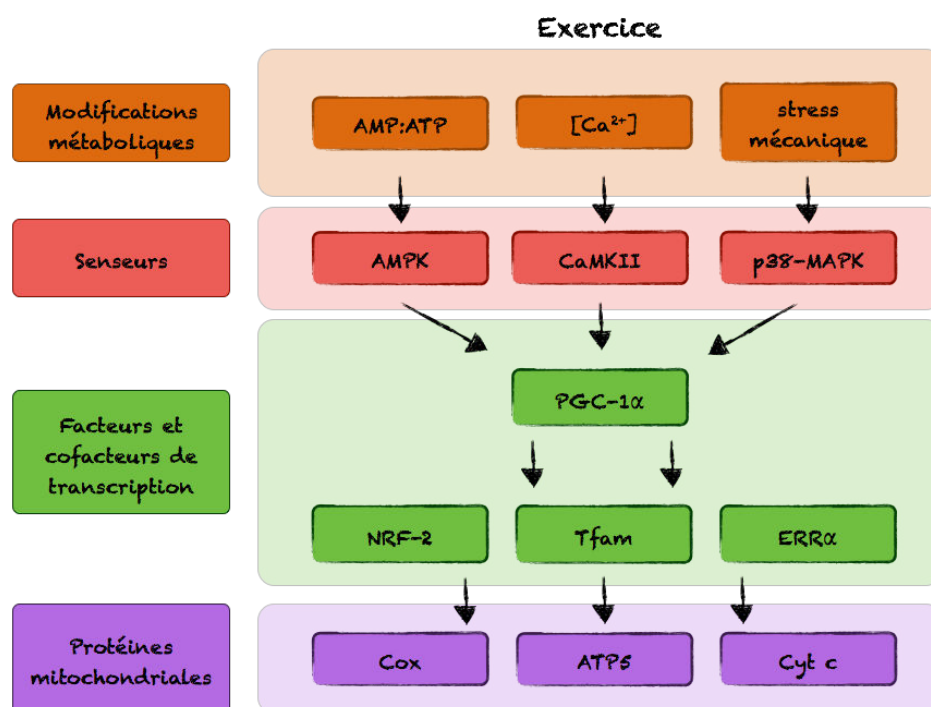


Figure 19. Couplage excitation-transcription.

3.1. Perturbations cellulaires

Lors de la contraction musculaire, différentes modifications ont lieu, au sein de la cellule, telles que le rapport AMP/ATP, les flux de calcium (Ca^{2+}) cytosolique, le niveau de pression tissulaire en O_2 , la tension mécanique et la quantité de radicaux libres d'oxygène. Ces perturbations de l'homéostasie cellulaire sont détectées par des senseurs qui traduisent ces variations et activent une cascade de réactions moléculaires. Ces dernières régulent la plasticité musculaire. En période d'entraînement, les caractéristiques de l'exercice déterminent les réponses métaboliques et moléculaires qui, répétées, vont conduire à des adaptations physiologiques à long terme. Ce mécanisme, appelé couplage excitation-transcription, assure la continuité entre les événements bioénergétiques et mécaniques consécutifs à l'exercice et l'expression génique. Différents signaux cellulaires sont à l'origine de la transduction du signal régulant la plasticité musculaire au cours de l'exercice comme la modification du rapport AMP/ATP, les flux de calcium (Ca^{2+}) cytosolique, le stress mécanique, le stress oxydant et le niveau de pression tissulaire en O_2 . Ces signaux vont activer des senseurs métaboliques (kinases) qui vont à leur tour activer des facteurs de transcription dont le rôle est de se positionner sur les gènes pour induire leur expression. Les kinases vont également moduler l'activité de différents cofacteurs de transcription qui participent à l'expression génique.

3.2. Kinases

Les kinases sont des enzymes, du groupe des transférases, catalysant les réactions de phosphorylation par l'ajout d'un ion phosphate à une molécule cible à partir de l'ATP. La molécule cible, appelée substrat, peut être une protéine, un lipide, un sucre ou une autre kinase. Les kinases sont plus ou moins spécifiques et sont régulées par des combinaisons de seconds messagers. Elles sont des régulateurs clés du fonctionnement des cellules. En ajoutant un groupe phosphate à des protéines substrats, les kinases dirigent l'activité, la localisation et la fonction de nombreuses protéines, et permettent d'orchestrer l'activité de la quasi-totalité des processus cellulaires. Les kinases sont particulièrement importantes dans la transduction du signal et la coordination de fonctions complexes. La phosphorylation des protéines joue également un rôle critique dans la communication intercellulaire et dans les réponses physiologiques à l'exercice.

Les kinases majeures impliquées dans le processus de la biogenèse mitochondriale sont l'AMP-activated protein kinase (AMPK), Ca^{2+} /calmoduline-dependante protein kinase II (CaMKII) et p38-Mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK). Elles vont réagir aux modifications respectives du rapport AMP/ATP, des flux de calcium cytosolique et du stress mécanique. Dans cette partie, nous allons caractériser ces trois kinases et étudier leur implication dans la biogenèse mitochondriale.

3.2.1. AMPK

Cette kinase, sensible aux modifications du rapport AMP/ATP, est impliquée dans la régulation de processus consommateurs et producteurs d'ATP (Hardie et Carling 1997).

3.2.1.1. Composition

C'est une kinase Sérine/Thréonine hétérotrimérique contenant une unité catalytique : alpha (α), et deux unités régulatrices : bêta (β) et gamma (γ) (Hardie 2007). Tandis que les deux premières sous-unités peuvent avoir deux expressions géniques ($\alpha 1$ et $\alpha 2$; $\beta 1$ et $\beta 2$), la troisième peut être représentée sous trois formes ($\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$) (Hardie et Sakamoto 2006). Il existe donc douze combinaisons théoriquement possibles. Dans le muscle *vastus lateralis* humain, seuls trois hétérotrimères ont été trouvés dans une quantité détectable, avec la proportion suivante : $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1 \gg \alpha 2/\beta 2/\gamma 3 \geq \alpha 1/\beta 2/\gamma 1$ (Wojtaszewski et al. 2005).

La sous-unité α contient un domaine serine/thréonine, α -KD, sur l'extrémité N-terminale immédiatement suivi par un domaine d'auto-inhibition, α -AID. L'extrémité C-terminale de l' α -AID marque la frontière entre ce qui peut être appelé le « module catalytique » et le « module de liaison » ; ce dernier contenant les domaines de liaisons pour les domaines C-terminaux de la sous-unités α et β (α - et β -CTD), ainsi que la sous-unité γ (Crute et al. 1998).

La sous-unité β contient un domaine central (β -CBM) permettant le lien avec des particules de glycogène (Hudson et al. 2003; Polekhina et al. 2003; Bendayan et al. 2009) et une région C-terminale agissant comme un domaine d'attache pour les sous-unités α et γ (Iseli et al. 2005; Townley et Shapiro 2007). Le rôle physiologique du lien avec une particule

de glycogène n'est pas très bien compris mais il a été montré que l'AMPK peut détecter l'état structural du glycogène (McBride et al. 2009). L'hypothèse avancée par Hardie (2011) est que l'AMPK surveille l'état des réserves de glycogène et s'assure qu'elles sont rapidement reconstituées une fois épuisées. Ainsi, l'AMPK peut détecter la disponibilité de l'énergie et à moyen terme les réserves immédiates sous forme de glycogène. Les deux sous-unités β ($\beta 1$ et $\beta 2$) peuvent être myristoylées et phosphorylées, et ces modifications peuvent influencer l'activation et la localisation intracellulaire de l'AMPK (Warden et al. 2001; Oakhill et al. 2010).

La sous-unité γ contient une région N-terminale impliquée dans l'interaction avec le domaine C terminal de la sous-unité β suivi par quatre séquences cystathionine- β -synthase (CBS, domaines Bateman) qui se répètent, capables de se lier avec un nucléotide d'adénine, tel que l'AMP ou l'ATP (Scott et al. 2004; Townley et Shapiro 2007; Xiao et al. 2007). Les sous-unités γ se lient avec l'AMP et l'ATP d'une manière mutuellement exclusive ([figure 20](#)).

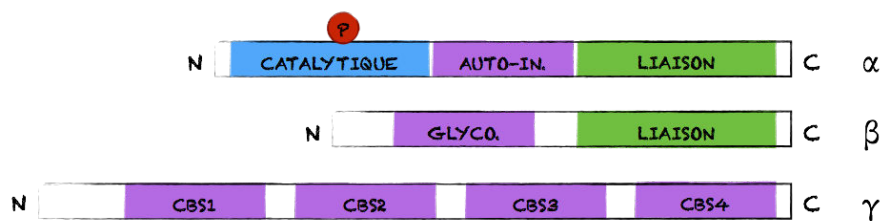


Figure 20. Sous unités de l'AMPK, inspiré de Viollet et al. (2009)

Sous-unités α , β et γ . Auto-in., auto-inhibition ; Glyco., glycolitique ; CBS, séquences cystathionine- β -synthase ; P, groupement phosphate ; N, domaine N terminal ; C, domaine C terminal.

Les sous-unités α et β sont phosphorylées sur de multiples sites (Mitchell 1997; Woods et al. 2003). Cependant, la compréhension du rôle physiologique n'est identifié uniquement pour deux d'entre eux : Thréonine 172 (Thr172) et Serine 485/491 (Ser485/491) présents sur le sous-unité α .

3.2.1.2. Activation

Lors de la contraction du muscle, l'ATP est hydrolysé, c'est à dire qu'il est scindé en ADP + P_i , dans les fibres musculaires. Cette séparation libère de l'énergie, préalablement emmagasinée lors de l'association de ces deux molécules, qui va être utilisée pour le

mouvement des têtes de myosine ou leur rattachement à l'actine (la présence d'ATP sur la tête de myosine provoque une séparation avec l'actine). Pour reformer l'ATP utilisé, afin de maintenir ou réitérer une contraction, l'enzyme ADK va utiliser des ADP, en transférant le phosphate d'un ADP à un autre ADP. Cette réaction va conduire à la formation suivante : $ATP + ADP \rightarrow 2ADP$. L'exercice induit donc une diminution du taux d'ATP associée à une augmentation de celui de l'AMP, et donc une hausse du ratio AMP/ATP. L'AMPK possède deux sites de fixation qui peuvent recevoir aussi bien un ATP qu'un AMP. Au cours de l'exercice, les molécules d'AMP devenant plus nombreuses et les molécules d'ATP devant moins nombreuses, les AMPK vont davantage être liées à de l'AMP. La liaison de l'AMP à l'AMPK favorise son activation. Cette kinase sert de senseur métabolique en réagissant à la consommation d'ATP (Davies et al. 1995). De récentes études ont permis de découvrir que l'ADP pouvait, tout comme l'AMP, se lier à l'AMPK sur l'un des domaines CBS présents sur la sous-unité γ . Cela suggère que différents niveaux de stress cellulaires peuvent activer l'AMPK (Xiao et al. 2011; Hardie et al. 2011).

Activée lorsque la disponibilité en ATP diminue, l'AMPK inhibe des processus consommateurs d'ATP (synthèse des lipides, synthèse des protéines, etc.), stimule des processus producteurs d'ATP (transport du glucose, oxydation des acides gras, etc.) et module la transcription de protéines impliquées dans la biogénèse mitochondriale (Hardie 2007) dans le but de palier à cette consommation ([figure 21](#)).

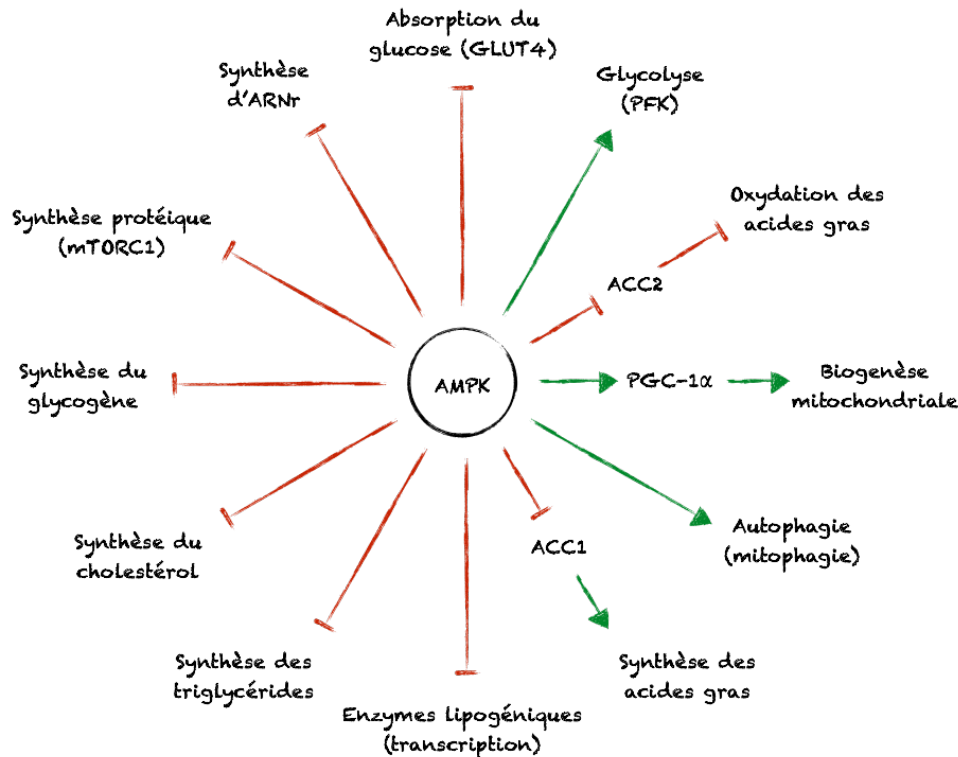


Figure 21. Les différentes voies d'activation et d'inhibition de l'AMPK, à partir de Hardie (Hardie 2014).

Les traits rouges représentent une inhibition et les flèches vertes une stimulation. AMPK, AMP-activated protein kinase; ACC1/2, acetyl-CoA carboxylase 1/2 ; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α ; GLUT4, Glucose transporter type 4; PFK, phosphofructokinase ; mTORC1, complexe mTOR 1.

La régulation des processus anaboliques et cataboliques par l'AMPK s'effectue donc de façon aiguë, mais aussi chronique, avec l'induction de la biogenèse mitochondriale. Son implication dans la gestion du stress cellulaire et du potentiel oxydatif fait d'elle un élément incontournable dans les syndromes métaboliques qui mènent aux dysfonctionnements de ces éléments (pour revue, voir Viollet et al. 2010). Fait intéressant, l'exercice est reconnu comme un stimulateur important de l'AMPK (Fujii et al. 2000; Wojtaszewski et al. 2000; Chen et al. 2000). Par exemple, Fujii et al. (2000) ont observé une augmentation de l'activité de l'AMPK α 2 2,5 fois supérieure au repos après 60 min de pédalage à 70% $\dot{V}O_{2max}$.

Les phosphorylations de l'AMPK sur le site Thr172 est bien corrélée avec l'activité totale de la kinase dans le muscle squelettique humain (Wojtaszewski et al. 2002; Birk et Wojtaszewski 2006). La phosphorylation de ce site et de sa cible, l'acetyl-CoA carboxylase

(ACC), sont largement utilisées comme des bio-marqueurs de l'activation de l'AMPK, grâce à des anticorps phospho-spécifiques. La présence d'AMP sur les domaines cystathionine-b-synthase (CBS) de la sous-unité γ ne semble pas influencer la phosphorylation de l'AMPK (Suter et al. 2006). Cependant, la fixation d'AMP va inhiber sa déphosphorylation par la Protein Phosphatase 2C alpha (PP2C α) et, de ce fait, augmenter son activité (Davies et al. 1995; Suter et al. 2006; Sanders et al. 2007).

Le résidu Thr172 de la sous-unité α de l'AMPK a été identifié comme le site majeur phosphorylé par les kinases de l'AMPK (AMPK kinase, AMPKK) (Hawley et al. 1996). Quatre protéines ont été identifiées comme AMPKK :

- **LKB1** : Liver Kinase B1 est une kinase Serine/Thréonine. Elle forme un complexe, avec Sterile-20-related adaptor (STRAD) et Mouse protein 25 (MO25), qui influence son activité et sa localisation subcellulaire. L'exercice ne modifie pas l'activité de LKB1. Plusieurs études suggèrent que LKB1 est constitutivement active et ne limite pas l'activation de l'AMPK (Lizcano et al. 2004; Sakamoto et al. 2004; Fogarty et Hardie 2009). Chez les souris déficientes en LKB1 dans le muscle squelettique, l'activité basale de l'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK est considérablement réduite et n'est pas augmentée par la contraction musculaire. L'impact est moins marqué pour l'isoforme $\alpha 1$ dont l'activité basale n'est pas modifiée et la réponse à la contraction musculaire est diminuée (Sakamoto et al. 2005). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres AMPKK.
- **CAMKK** : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (α et β) est dépendante du Ca²⁺/CaM pour son activité maximale de kinase (Tokumitsu et Soderling 1996) et peut phosphoryler l'AMPK (Hurley 2005; Hong et al. 2005; Hawley et al. 2005; Woods et al. 2005). Cependant, *in vivo*, la déficience en LKB1 couplée à l'inhibition de CaMKK ne montre pas une inhibition complète de l'AMPK, laissant la possibilité de l'existence d'une AMPKK résiduelle (Hurley 2005).
- **TAK1** : Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 a été originellement identifiée comme une Mitogen-activated protein kinase (MAPK) qui est en amont des membres de la famille des MAPK activées par le stress mécanique. Identifiée *in vivo* comme une AMPKK directe, son mécanisme reste encore flou (Momcilovic et al. 2006).

- **ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated protein kinase est un membre de la superfamille des phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase). Elle contrôle la progression du cycle cellulaire en phosphorylant et en activant plusieurs protéines comme p53 (Banin et al. 1998; Canman et al. 1998). Dans la cellule, le traitement à l'AICAR peut mener à la phosphorylation de l'AMPK de façon dépendante à l'ATM (Sun et al. 2007).

3.2.1.3. Inhibition

La phosphorylation de l'AMPK sur le résidu Ser485/491 est quant à elle associée à une inhibition de la kinase. Ce site a été identifié comme un site d'autophosphorylation et un site cible de la protéine kinase B (Akt) (Horman et al. 2006; Soltys et al. 2006) et p70S6 (Dagon et al. 2012). En effet, l'insuline et l'IGF-1 augmentent la phosphorylation du résidu Ser485/491 de l'AMPK, par le biais majoritaire d'Akt, entraînant une réduction subséquente de l'activité de l'AMPK (de 40 à 70%) sans aucun changement dans la phosphorylation du résidu Thr172. L'activité de l'AMPK peut ainsi être modifiée par son site d'activation (Thr172) mais aussi par son site d'inhibition (Ser485/491) (Hurley et al. 2006).

3.2.1.4. Stabilité

La durée d'activation et de vie d'une protéine, que l'on nomme stabilité, peut être limitée par une destruction causée par une autre protéine. Dans le tissu brun adipeux et le foie, cell death-inducing DFFA-like effector A (CIDEA), une protéine régulant la dépense énergétique (Zhou et al. 2003), est impliquée dans la dégradation de l'AMPK. Ce nouveau mécanisme régule l'activité de l'AMPK indépendamment de l'AMP et des processus de phosphorylation ou de déphosphorylation. Dans le réticulum endoplasmique, CIDEA est co-localisée avec l'AMPK et forme un complexe avec l'AMPK, *via* une interaction spécifique avec la sous-unité β . Quand l'AMPK est co-exprimée avec CIDEA, la stabilité de la sous-unité β de l'AMPK est fortement réduite en raison d'une augmentation de sa dégradation médiée par l'ubiquitination (Qi et al. 2008). La présence de ce mécanisme dans le muscle squelettique reste à élucider.

3.2.1.5. Localisation

Dans différents types cellulaires, dont la cellule musculaire squelettique, des études d'immunofluorescence et d'immunoblot ont révélé que l'AMPK possédant la sous-unité $\alpha 2$ (AMPK $\alpha 2$) se localisait dans le noyau et/ou le cytoplasme, tandis l'AMPK $\alpha 1$ se situait dans le cytoplasme. Lorsque la cellule subit diverses stimulations (leptine, adiponectine et AICAR), l'AMPK $\alpha 2$ se transloque vers le noyau et y est phosphorylée sur Thr172. Au contraire, l'AMPK $\alpha 1$ ne subit pas de translocation vers le noyau même lorsqu'elle est activée. Chez l'homme, ce flux transitoire d'AMPK $\alpha 2$ a été observé lors de l'exercice (McGee et al. 2003). L'utilisation d'AMPK $\alpha 2$ Thr172 mutants mimant la phosphorylation du résidu (T172M), par le biais d'une kinase morte (T172K) ou d'une phosphorylation défectueuse (T172D), a permis de mettre en évidence le rôle de la phosphorylation du résidu Thr172 dans les mouvements cellulaires de l'AMPK $\alpha 2$. Les résultats indiquent que la phosphorylation de Thr172 est essentielle pour la translocation nucléaire d'AMPK $\alpha 2$ et que la déphosphorylation ultérieure de ce résidu est nécessaire pour le retour d'AMPK $\alpha 2$ vers le cytoplasme (Suzuki et al. 2007; Kim et al. 2014). On constate des résultats mitigés pour la localisation de T172M qui resterait uniquement dans le noyau (Kim et al. 2014) ou serait présent dans le cytoplasme avant la stimulation (Suzuki et al. 2007). Cette deuxième configuration indique que d'autres facteurs, autres que la phosphorylation de Thr172, sont nécessaires pour la translocation nucléaire de l'AMPK $\alpha 2$.

Des mouvements similaires à AMPK $\alpha 2$ sont observés pour l'AMPK $\beta 2$ (Kodiha et al. 2007). Suzuki et al. (2007) ont observé la nécessité de $\beta 2$ pour la phosphorylation et la translocation nucléaire de $\alpha 2$. $\beta 1$, quant à lui, est nécessaire pour la relocalisation de $\alpha 2$ dans le cytoplasme. La myristoylation (i.e. Ser24, Ser25) et la phosphorylation (i.e. Ser182) de la sous-unité β de l'AMPK modulent l'activité enzymatique et la localisation cellulaire de la sous-unité α (Warden et al. 2001). $\beta 1$ apparaît comme nécessaire pour l'ancrage des AMPK formés de l'isoforme $\alpha 2$ aux organites du cytoplasme, tel que les mitochondries. Cet ancrage permettra la phosphorylation de protéines cibles comme l'ACC.

La sous-unité $\gamma 1$ participe, elle aussi, à la phosphorylation de Thr172 et à la translocation nucléaire de la sous-unité $\alpha 2$ (Suzuki et al. 2007).

3.2.1.6. Implication dans la biogenèse mitochondriale

Les études, ciblant l'accroissement de l'activité de l'AMPK de façon pharmacologique (AICAR ou acide b-guanadinopropionique) ou transgénique (Tg-AMPK γ 3^{225Q}), dans la cellule musculaire en culture ou le muscle squelettique de souris, ont montré une augmentation de la biogenèse mitochondriale à l'aide de marqueurs directs ou indirects (Winder et al. 2000; Zong et al. 2002; Suwa et al. 2003; Jorgensen et al. 2005; Jorgensen et al. 2007; Barré et al. 2007; Irrcher et al. 2008; Narkar et al. 2008; Garcia-Roves et al. 2008). Les effets de la stimulation pharmacologique de l'AMPK sur les marqueurs de la biogenèse mitochondriale sont abolis lorsque l'AMPK α n'est pas exprimée (Zong et al. 2002; Jorgensen et al. 2005; Jorgensen et al. 2007). Les souris génétiquement modifiées pour présenter un déficit en AMPK α , de l'un ou de ses deux isoformes α , dans le corps entier ou uniquement le muscle squelettique, présentent une capacité d'exercice ou une activité volontaire diminuée ainsi qu'une altération de la force de contraction (Mu et al. 2001; Fujii et al. 2007; Lantier et al. 2014). Cependant, une étude montre aucune diminution de l'activité volontaire suite à un déficit en AMPK α 2 (Röckl et al. 2007). Ces données suggèrent néanmoins une altération de la fonction mitochondriale. L'AMPK présente une implication mitigée sur l'aspect quantitatif de la biogenèse mitochondriale par l'exercice, mais un rôle évident sur l'aspect qualitatif (c.-à-d. la fonction mitochondriale) (Jorgensen et al. 2005; Jorgensen et al. 2007; Röckl et al. 2007; Lantier et al. 2014).

L'induction de la biogenèse mitochondriale par l'AMPK semble en majeure partie se faire par le biais de PGC-1 α . L'AMPK influence PGC-1 α par le biais de trois mécanismes : 1) en modulant indirectement l'activité du promoteur du gène PGC-1 α (via cAMP response elements-binding protein (CREB) et Histone deacetylase 5 (HDAC5)), 2) en modulant directement l'activité de la protéine PGC-1 α et 3) en modulant indirectement l'activité de la protéine PGC-1 α (via Silent information regulator 1 (SIRT1)) ([figure 22](#)). Ce sont ces différents mécanismes que je vais détailler dans les parties suivantes.

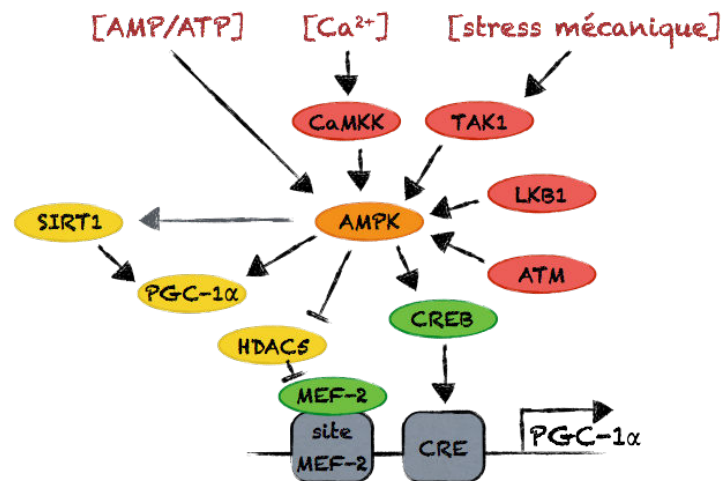


Figure 22. Voie de l'AMPK.

3.2.1.6.1. Lien avec PGC-1 α

PGC-1 α , co-activateur majeur de la biogenèse mitochondriale, influe sur sa propre expression et peut se lier à plusieurs facteurs de transcription clefs pour décupler leur effet (Puigserver et al. 1998; Wu et al. 1999; Handschin et Spiegelman 2006). Nous allons nous intéresser au lien qui existe entre l'AMPK et PGC-1 α afin d'identifier le rôle de chacun dans le processus de la biogenèse mitochondriale.

Une augmentation concomitante de l'activité de l'AMPK et de PGC-1 α a été observée en réponse à l'AICAR ou à l'exercice (Terada et al. 2002; Irrcher et al. 2003; Jorgensen et al. 2005; Irrcher et al. 2008), suggérant que les effets de l'activation de l'AMPK sur les gènes mitochondriaux peuvent être atteints grâce à la régulation de PGC-1 α . Cette piste a été appuyée par les similitudes phénotypiques apparaissant chez les souris présentant des délétions spécifiques de l'AMPK ou de PGC-1 α , les deux affichant une réduction de l'expression des gènes mitochondriaux et une intolérance à l'exercice (Mu et al. 2001; Jorgensen et al. 2005; Röckl et al. 2007; Fujii et al. 2007). De plus, un certain nombre de stratégies pharmacologiques ou transgéniques, majorant l'activité de l'AMPK ou de PGC-1 α , ont toutes systématiquement potentialisé les capacités d'endurance des souris et ont orienté les fibres musculaires vers un profil plus oxydatif (Lin et al. 2002; Suwa et al. 2003; Lagouge et al. 2006; Narkar et al. 2008; Garcia-Roves et al. 2008). Les similitudes importantes entre l'AMPK et PGC-1 α ont suggéré que PGC-1 α pourrait être un médiateur important de

l'expression génique induite par l'AMPK. Ce lien a pu être montré, chez les souris, avec la diminution du contenu des ARNm et de la protéine PGC-1 α à la suite d'une suppression complète ou partielle de l'AMPK α (Röckl et al. 2007; Lantier et al. 2014). De plus, les souris traitées avec un activateur pharmacologique de l'AMPK ont montré une augmentation de l'activité du promoteur de PGC-1 α , de son niveau d'ARNm et de protéine PGC-1 α dans le muscle squelettique (Zong et al. 2002; Suwa et al. 2003; Jorgensen et al. 2005; Lee et al. 2006; Irrcher et al. 2008; Narkar et al. 2008) ; une augmentation abolie lorsque l'AMPK est mutée (Zong et al. 2002; Jorgensen et al. 2005). Une solide preuve de ce lien a été fournie par le fait que l'AICAR était incapable d'augmenter l'expression génique dans les muscles de souris dépourvues de PGC-1 α (Jager et al. 2007). En tant que tel, PGC-1 α semble être le médiateur clé en aval des effets de l'AMPK sur la biogenèse mitochondriale.

Plusieurs mécanismes expliquent comment l'AMPK impacte PGC-1 α . Par exemple, elle peut directement phosphoryler PGC-1 α sur Thr177 et Ser538 dans les essais *in vitro* (Jager et al. 2007). La phosphorylation de PGC-1 α pourrait ne pas affecter directement son activité de co-activation, mais plutôt la libérer d'une protéine répressive (Fan et al. 2004), et/ou permettre la désacétylation et l'activation par SIRT1 (Cantó et al. 2009; Cantó et al. 2010). En outre, l'activation de l'AMPK augmente l'expression de PGC-1 α dans le muscle (Baar et al. 2002; Suwa et al. 2003), un effet qui est susceptible d'être atteint par l'autorégulation de PGC-1 α sur son propre promoteur (Handschin et al. 2003; Amat et al. 2009). L'AMPK peut influencer PGC-1 α par le biais de deux autres mécanismes : en modulant indirectement l'activité de son promoteur via CREB et HDAC5, et celle de sa protéine via SIRT1.

3.2.1.6.2. Lien avec CREB

CREB est un facteur de transcription qui se lie sur aux régions promotrices contenant un site cAMP response elements (CRE) (Quinn et Granner 1990), ce qui est le cas de PGC-1 α (Herzig et al. 2001; Handschin et al. 2003).

Les effets de l'activation de l'AMPK sur les gènes mitochondriaux peuvent être atteints grâce à la régulation d'un certain nombre de facteurs et cofacteurs de transcription. L'AMPK a été identifiée comme un régulateur de l'expression de l'hexokinase II (HK2) dans le muscle squelettique de souris (Jorgensen et al. 2007; Thomson et al. 2008). Les rapports précédents

montrent un site CRE sur la région promotrice du gène HK2 (Osawa et al. 1996), suggérant alors que CREB pourrait être une cible de l'AMPK.

La stimulation des cellules HEK-293 avec de l'AICAR a induit une augmentation de la transcription du gène CREB et de la phosphorylation de la protéine CREB. Cette élévation a été bloquée avec un inhibiteur de l'AMPK (composé C) (Thomson et al. 2008). Ce type de stimulation a aussi donné lieu à la phosphorylation de CREB dans les muscles *epitrochleus* de rat. Des essais radio-isotopiques ont permis de constater que l'AMPK phosphoryle CREB1, CRE modulator (CREM), et CREB-like 2 (CREBL2) dans le muscle de rat (Thomson et al. 2008). Pour conclure, la protéine CREB, et ses homologues, sont des cibles directes de l'AMPK et sont donc probablement impliqués dans la médiation des effets de l'AMPK sur l'expression des gènes ayant un site CRE sur leur promoteur, comme le gène PGC-1 α . Il est donc avancé que l'AMPK peut influencer l'activité du promoteur de PGC-1 α par le biais de CREB.

3.2.1.6.3. Lien avec HDAC5

HDAC5 inhibe la transcription des gènes en bloquant l'accès à l'ADN (McKinsey et al. 2001a). La dissociation de HDAC5 de myocyte enhancer factor 2 (MEF2), un facteur de transcription situé sur la région promotrice du gène PGC-1 α , survient à la suite de la phosphorylation de HDAC5 (McKinsey et al. 2000a) et permet à MEF2 d'être activé (McKinsey et al. 2001a). La dissociation de HDAC5 de MEF2 et l'augmentation subséquente de l'exportation nucléaire de HDAC5 sont associées à une expression accrue du gène GLUT4 dans le muscle squelettique humain (McGee et Hargreaves 2004). La phosphorylation de HDAC5 est partiellement bloquée suite à l'inhibition pharmacologique de la voie des CaMKs (McKinsey et al. 2002a). Fait intéressant, l'augmentation de l'activité de l'AMPK, observée au cours de l'exercice (Fujii et al. 2000), est associée à une expression accrue du gène GLUT4 (Kraniou et al. 2000). De plus, le traitement avec l'activateur de l'AMPK (AICAR) résulte en une expression accrue du gène GLUT4 dans le muscle squelettique (Holmes et al. 1999). Ces résultats suggèrent que l'AMPK est une autre kinase potentielle de HDAC5, une hypothèse confirmée par les travaux de McGee et al. (2008).

Afin de déterminer si l'AMPK peut phosphoryler HDAC5, des plasmides de HDAC5 exprimant soit un type sauvage, une serine 259 mutante alanine (S259A), une sérine 498

mutante alanine (S498A), soit une double serine 259 et 498 mutante alanine (S259/498A), ont été transfectés dans des cellules Cos7 (fibroblaste de rein de singe). Ces serines, une fois phosphorylées, entraîne la dissociation de HDAC depuis MEF2. L'incubation de HDAC5 de type sauvage avec de l'AMPK a entraîné la phosphorylation de HDAC5 ; fait non observé lorsque l'AMPK était absente (McGee et al. 2008). La mutation de la Ser259 était suffisante pour bloquer la phosphorylation de HDAC5 par l'AMPK et la mutation de la Ser498 a montré que l'AMPK ne phosphoryle que faiblement la Ser259 (McGee et al. 2008). Ces résultats suggèrent que l'AMPK phosphoryle HDAC5 dans le muscle squelettique humain, permettant la libération du site MEF2 présent sur le promoteur de PGC-1 α (Handschin et al. 2003).

3.2.1.6.4. Lien avec SIRT1

Les sirtuines (SIRT) sont des protéines influencées par le rapport NAD⁺/NADH. Elles peuvent désacétyler d'autres protéines et ainsi influencer sur la transcription génique. SIRT1 peut interagir directement avec le promoteur de PGC-1 α et le désacétyler (Rodgers et al. 2005). La désacétylation du gène PGC-1 α par SIRT1 est nécessaire pour la transcription des gènes mitochondriaux et de PGC-1 α lui-même (Gerhart-Hines et al. 2007; Amat et al. 2009). Il semblerait que la phosphorylation de la protéine PGC-1 α permette la désacétylation du gène PGC-1 α , et c'est cette dernière qui augmenterait l'activité de son promoteur (Cantó et al. 2009; Cantó et al. 2010) ; PGC-1 α étant impliqué dans sa propre régulation (Handschin et al. 2003; Amat et al. 2009).

L'AICAR ne permettait pas de diminuer l'acétylation de PGC-1 α lorsque l'expression de SIRT1 était abolie, confirmant que la désacétylation de PGC-1 α est un mécanisme indispensable pour l'activation du promoteur de PGC-1 α (Cantó et al. 2009). De manière similaire, l'injection d'AICAR, dans les cellules C2C12 sur-exprimant le mutant R13 PGC-1 α (non-acetylable), n'augmente pas l'expression du promoteur de PGC-1 α (Cantó et al. 2009). Ensemble, ces données indiquent que l'expression du gène PGC-1 α régulée par l'AMPK est modulée par SIRT1.

L'activité de SIRT1 étant conduite par les niveaux de NAD⁺ (Tanny et Moazed 2001), on s'est interrogé sur la possible implication de l'AMPK dans les niveau de NAD⁺ ou dans l'évolution du ratio NAD⁺/NADH. Effectivement, l'AICAR augmente le ratio de NAD⁺/NADH dans les cellules C2C12 comme c'est le cas dans le muscle squelettique après

l'exercice (Cantó et al. 2009). Cette augmentation du ratio NAD^+/NADH a été évidente 4h après l'injection de l'AICAR et est restée élevée jusqu'à 12h après, un timing qui correspond parfaitement avec la désacétylation de PGC-1 α (Cantó et al. 2009).

Afin d'identifier par quel moyen l'AMPK modifie le ratio NAD^+/NADH , plusieurs inhibiteurs ont été utilisés. Le blocage aigu de l'activité de NAMPT, un intermédiaire de la biosynthèse des NAD, avec l'inhibiteur spécifique FK866 n'a pas d'incidence sur la capacité de l'AICAR à moduler l'acétylation de PGC-1 α ou le rapport NAD^+/NADH . Il en est de même pour l'inhibition de l'enzyme glycolytique, la lactate déshydrogénase (LDH), avec de l'acide oxamique qui n'a pas affecté la capacité de l'AICAR à augmenter les taux de NAD^+ et le rapport NAD^+/NADH . Cependant, l'inhibition de l'oxydation des acides gras mitochondriaux, avec de l'étomoxir, a freiné la hausse du rapport NAD^+/NADH induite par l'AMPK (Cantó et al. 2009). Cela indique qu'une augmentation de la β -oxydation mitochondriale est requise pour que l'AMPK augmente le rapport NAD^+/NADH . Soutenant le rôle de l'activité de SIRT1 sur le rapport NAD^+/NADH , l'étomoxir a aboli la désacétylation de PGC-1 α induite par l'AMPK (Cantó et al. 2009). Les actions aiguës de l'AMPK sur l'oxydation des lipides modifient l'équilibre entre le NAD^+ et le NADH cellulaire, ce qui agit comme un message pour activer SIRT1. En outre, l'interaction entre SIRT1 et l'AMPK pourrait être réciproque, comme les agonistes spécifiques de SIRT1 qui promeuvent l'oxydation des acides gras et activent indirectement l'AMPK par des adaptations métaboliques (Feige et al. 2008) ([figure 23](#)).

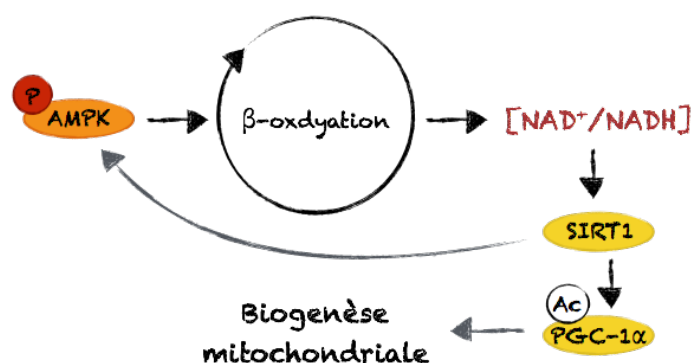


Figure 23. Relation entre AMPK et SIRT1

POINTS CLEFS

- L'AMPK est phosphorylée par plusieurs kinases : LKB1, CaMKK, TAK1 et ATM.
- L'augmentation d'AMP et d'ADP va activer l'AMPK.
- Une fois active, l'AMPK va pouvoir :
 - phosphoryler la protéine PGC-1 α ,
 - augmenter indirectement l'activité de SIRT1 qui désacétyle PGC-1 α , un mécanisme indispensable pour rendre PGC-1 α actif,
 - lever l'inhibition d'HDAC5 sur le site MEF-2*,
 - activer le facteur de transcription CREB dont la cible est le site CRE*.

*ces deux sites sont présents sur la région promotrice de PGC-1 α .

3.2.2. CaMKII

Pour réaliser une contraction musculaire, le potentiel d'action en provenance du motoneurone va se propager le long de l'axone puis être transmis à la fibre musculaire pour se propager le long de son sarcolemme, la membrane entourant les myofibrilles, jusqu'aux tubules transverses (T). Par l'intermédiaire de ces derniers qui pénètrent au cœur de la fibre, le potentiel d'action peut atteindre toutes les myofibrilles. Pour finir, le potentiel d'action atteint le réticulum endoplasmique entraînant la libération des ions Calcium (Ca^{2+}) contenus dans celui-ci. Le Ca^{2+} qui transite dans le cytoplasme va se fixer sur la troponine c et libérer les sites de fixation des ponts actine-myosine. Il sera ensuite pompé pour réintégrer le réticulum endoplasmique.

La calmoduline (CaM), une protéine ubiquitaire, possède 4 motifs structuraux capables de s'associer avec un atome de Ca^{2+} . Présente dans la cellule, elle présente une grande affinité pour le Ca^{2+} . Sa liaison avec le Ca^{2+} induit un changement de conformation de la protéine et aboutit à la formation d'un complexe Ca^{2+} -CaM. Ce complexe active de nombreuses protéines dont les Ca^{2+} /calmoduline-dépendante protein kinases (CaMKs). Lorsque le Ca^{2+} est présent dans le cytoplasme, sa liaison avec la CaM agit comme une voie de transduction de signal du Ca^{2+} conduisant à une réponse transcriptionnelle.

3.2.2.1. Composition

C'est une kinase Sérine/Thréonine multimérique. Elle contient un domaine catalytique N-terminal, suivi par un domaine d'autorégulation, et se termine par un domaine d'association C-terminal ([figure 24](#)). Cette kinase a de multiples isoformes (α , β , γ , et δ), avec plusieurs variants d'épissage, par exemple : β_M , β et β_e pour CaMKII β . Les isoformes de CaMKII sont présents dans la plupart des tissus chez les mammifères, tels que le muscle squelettique, le foie, le cœur et le cerveau (Hashimoto et Soderling 1987). Même si l'ensemble des isoenzymes semblent avoir une régulation identique, la différence d'expression et de localisation subcellulaire des isoformes de CaMKII dans les différents tissus (Hashimoto et Soderling 1987) suggère l'existence de différences dans leurs fonctions et leurs mécanismes.

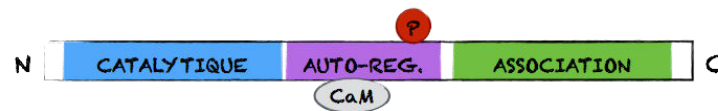


Figure 24. Composition de la protéine CaMKII

Auto-rég., auto-régulation ; CaM, calmoduline ; P, groupement phosphate, N, domaine N terminal ; C, domaine C terminal.

3.2.2.2. Auto -inhibition et -activation

Plusieurs CaMKs s'agrègent en homo- ou hétéro-oligomères pour former un complexe protéique composé de deux sous-ensembles ou plus, constitués par un seul ou différents types de molécules ([figure 25](#)).

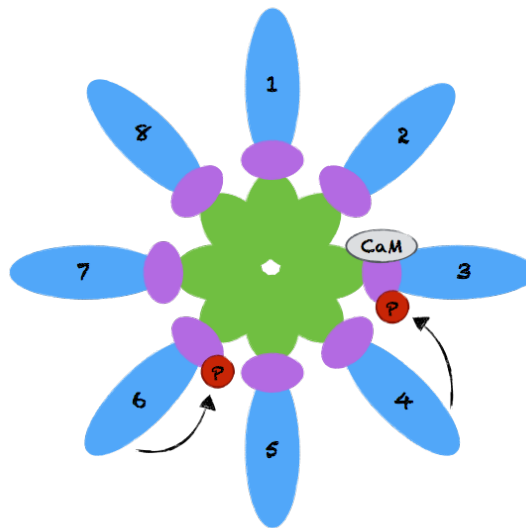


Figure 25. Oligomère CaMK

Etant donné que CaMKIV n'est pas exprimée dans le muscle squelettique humain (Rose et al. 2006), CaMKII apparaît comme la CaMK majeure dans ce tissu pour la transduction du signal du Ca^{2+} , une idée renforcée par le fait que cette kinase est activée avec l'exercice (Rose et al. 2006). En l'absence de liaison avec le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, le domaine catalytique de CaMKII est auto-inhibé par son domaine régulateur qui contient une séquence de type pseudo-substrat (pour revue, voir Kemp et al. 1994). Brièvement, la partie d'auto-inhibition de ce domaine possède un résidu qui mime l'ATP ou la protéine substrat pour interagir avec le domaine catalytique, bloquant ainsi l'accès aux substrats. La liaison de

l'activateur allostérique $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ modifie la conformation du domaine d'auto-inhibition afin de permettre l'accès des substrats au site catalytique. Lors de l'activation par le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, les CaM kinases activées s'auto-phosphorylent les unes les autres au niveau du résidu thréonine 286. La phosphorylation de la kinase augmente l'affinité pour le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et prolonge la durée d'activité de l'oligomère. Après la dissociation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, la kinase reste active. C'est ce que l'on appelle l'activité autonome (i.e., Ca^{2+} indépendante), qui prolonge encore l'état actif (figure 26). Ainsi, lorsque le stimulus d'activation est terminé et que la concentration en Ca^{2+} retourne à son niveau basal, l'activité de la kinase persiste. En l'absence d'attachement avec $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, CaMKII s'auto-phosphoryle sur Thr305 ou Thr306 dans le domaine liant la CaM. L'autophosphorylation de Thr305/Thr306 bloque la liaison de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Hanson et Schulman 1992), ce qui désensibilise la kinase à des augmentations ultérieures de Ca^{2+} . Les effets de l'autophosphorylation de Thr286 et Thr305/Thr306 sont opposés par de multiples protéines phosphatases. Ainsi, la signalisation intracellulaire via CaMKII dépend de l'équilibre dynamique entre les concentrations de Ca^{2+} , l'autophosphorylation et la déphosphorylation.

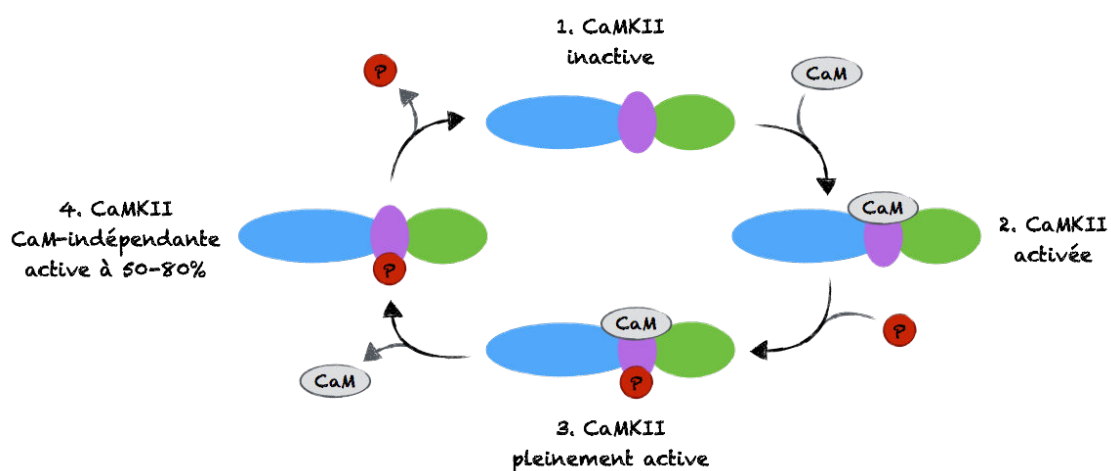


Figure 26. Interaction de CaMKII avec CaM et phosphorylation

L'activité de CaMKII, dans les prélèvements de muscle squelettique humain, peut être mesurée en présence ou absence de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ grâce à l'ajout d'un substrat. La présence du complexe renseigne sur l'activité maximale alors que l'absence du complexe renseigne sur l'activité autonome. Avec ce type d'analyse, Rose et *al.* (2006) ont mis en évidence un lien entre l'activité autonome de CaMKII et sa phosphorylation sur Thr287.

3.2.2.3. Implication dans la biogenèse mitochondriale

Dans une étude *in vitro* sur muscle squelettique de rat, l'utilisation d'un activateur (caféine), augmentant uniquement le Ca^{2+} cytosolique, a haussé l'expression de PGC-1 α et de Cox-I, un effet complètement aboli par l'ajout d'un inhibiteur spécifique de CaMKII (Wright et al. 2007a). Ces résultats suggèrent que CaMKII catalyse l'étape initiale de la voie par laquelle les flux de Ca^{2+} cytosolique active la biogenèse mitochondriale. L'activation de PGC-1 α par CaMKII, en réponse au signal du Ca^{2+} , semble passer par l'activation de CREB (Herzig et al. 2001; Handschin et al. 2003) et l'inhibition de HDAC4 (Michael et al. 2001; McKinsey et al. 2002b). Cette activation semble aussi passer par le biais d'une influence de CaMKII sur p38-MAPK (Wright et al. 2007a) ([figure 27](#)).

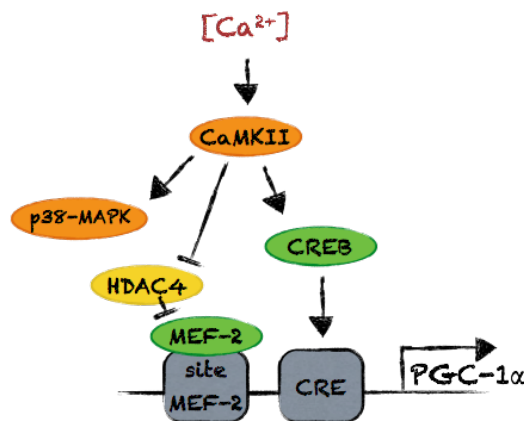


Figure 27. Voie de CaMKII.

3.2.2.3.1. Lien avec CREB

Comme nous l'avons vu précédemment, CREB est un facteur de transcription qui se lie sur le site CRE du gène PGC-1 α et active sa transcription (Herzig et al. 2001; Handschin et al. 2003). Dans les cellules C2C12, l'expression ectopique de CaMKIV augmente l'activité du promoteur du gène PGC-1 α (Handschin et al. 2003). CREB ayant été montré comme un activateur important de l'expression du gène PGC-1 α dans le foie dans des conditions de jeûne (Herzig et al. 2001), une protéine CREB dominante négative a été utilisée pour examiner le rôle potentiel de CREB dans le contrôle du promoteur de PGC-1 α par CaMKIV. L'utilisation de ce modèle a aboli l'effet de CaMKIV sur PGC-1 α (Handschin et al. 2003), confirmant le rôle de CREB comme intermédiaire dans la stimulation de PGC-1 α par CaMKIV.

Les CaMKs phosphorylent CREB au niveau de la Ser133, une phosphorylation nécessaire pour induire la transcription (Shaywitz et Greenberg 1999; Mayr et Montminy 2001). Parallèlement, l'inhibition de l'activité de CaMKII empêche complètement l'augmentation de l'expression de PGC-1 α induite par le Ca²⁺ (Wright et al. 2007a). Cela suggère que CaMKII phosphoryle CREB pour induire l'activation de PGC-1 α .

3.2.2.3.2. Lien avec les HDACs classe II

La répression de l'activation transcriptionnelle de MEF2 par la classe II des HDACs est régie par l'état de phosphorylation de HDAC. L'HDAC phosphorylée se lie à la protéine chaperone 14-3-3 dans le noyau et se déplace hors du noyau, par l'intermédiaire de la protéine d'exportation nucléaire CRM1, dans un complexe avec la protéine 14-3-3 (Grozing et Schreiber 2000; McKinsey et al. 2001b). La protéine 14-3-3 régule une multitude de protéines de signalisation en se liant à ces dernières. L'exportation de HDAC du noyau élimine l'inhibition de MEF-2 ([figure 28](#)).

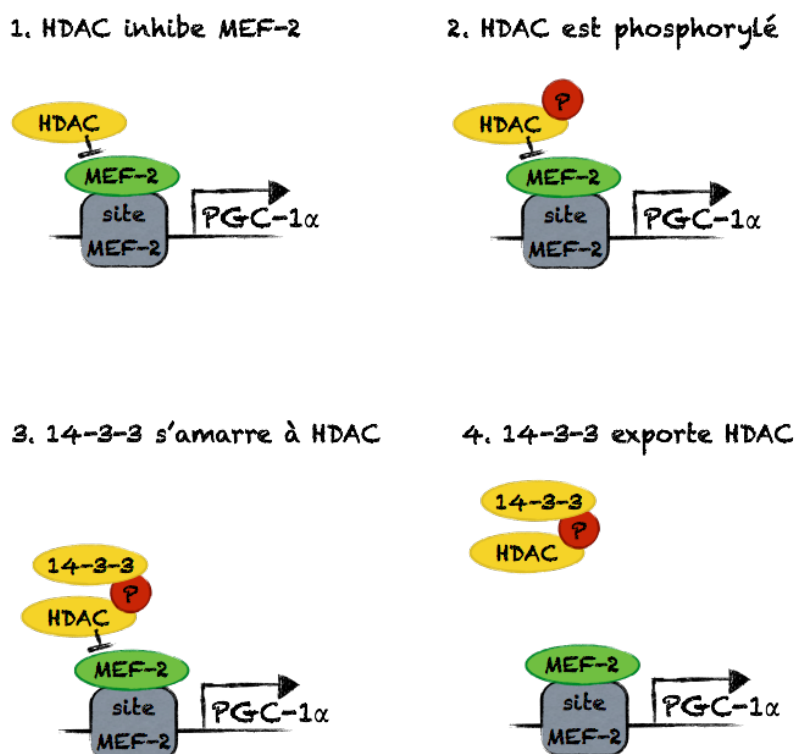


Figure 28. Levée d'inhibition des HDACs sur MEF-2

3.2.2.3.3. Lien avec p38-MAPK

Dans le muscle *épitrochlearis* de rat, l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique induit par la caféine augmente l'activité de CaMKII mais aussi la phosphorylation de p38-MAPK. Cette augmentation de p38-MAPK est bloquée par l'inhibiteur de CAMKII (KN93). Cela amène à considérer p38-MAPK comme une cible de CaMKII (Wright et al. 2007a), confirmant des résultats obtenus précédemment (Enslin et al. 1996; Elzi et al. 2001; Chan et al. 2004). De plus, l'augmentation du contenu en PGC-1 α et Cox-I, induite par le calcium, est complètement bloquée par l'ajout d'un inhibiteur de p38-MAPK (SB202190) (Wright et al. 2007a). Ces résultats suggèrent que p38-MAPK est située en aval de CaMKII qui transmet le signal du Ca^{2+} cytosolique pour augmenter l'expression de PGC-1 α et de la biogenèse mitochondriale.

POINTS CLEFS

- Les flux cytosoliques de Ca^{2+} vont activer CaMKII
- CaMKII va phosphoryler :
 - le facteur de transcription CREB, qui va se positionner sur le site CRE*
 - le cofacteur de transcription HDAC 4, qui va lever son inhibition sur MEF-2*
 - p38-MAPK, une kinase impliquée dans la transcription de PGC-1 α .

*ces deux sites sont présents sur la région promotrice de PGC-1 α .

3.2.3. p38-MAPK

La contraction musculaire permet de produire de la force et augmente la tension à l'intérieur de la cellule musculaire. L'étude de l'effet d'étirements passifs sur des muscles *in vitro* et *in situ* a mis en évidence que le stimulus mécanique induit des adaptations cellulaires. Les tensions mécaniques appliquées au muscle entraînent l'activation des voies de signalisation impliquant la calcineurine, les mitogen activated protein kinase (MAPK) ou le facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF) (Kumar et al. 2002; Hornberger et al. 2005). Les voies de signalisation sont modulées différemment selon que la tension soit appliquée de manière axiale ou transversale, malgré un degré de tension identique (Kumar et al. 2002). De manière similaire, les réponses cellulaires à un étirement uni-axial et multiaxial sont différentes (Hornberger et al. 2005). Ces résultats suggèrent que la cellule est capable de distinguer la manière dont les forces lui sont appliquées, induisant une activation différenciée des voies de signalisation. L'exercice, par ses caractéristiques de fréquence et d'intensité de contraction, peut donc induire des réponses cellulaires spécifiques favorisant, soit la synthèse protéique pour les exercices de résistance, soit la biogenèse mitochondriale pour les activités aérobies (Coffey et al. 2006). En phosphorylant divers substrats dans le cytosol et le noyau, les MAPK régulent des facteurs de transcription impliqués dans l'expression génique (Long et al. 2004). Le stress mécanique active trois sous catégories des MAPK : extracellular-regulated kinase (ERK1/2), c-jun N-terminal kinase (JNK) et p38-MAPK (Kramer et Goodyear 2007). C'est p38-MAPK qui nous intéresse dans ce manuscrit pour son lien direct avec PGC-1 α (Puigserver et al. 2001).

3.2.3.1. Composition

p38-MAPK (aussi appelée stress-activated protein kinase, SAPK) a été identifiée pour la première fois dans les études explorant la façon dont l'endotoxine bactérienne induisait l'expression de cytokines. p38 (p38 α) a été le premier isoforme isolé sous forme d'une protéine de 38-kDa rapidement phosphorylé sur un résidu tyrosine en réponse à la stimulation par les lipopolysaccharides (LPS). Ensuite, trois isoformes supplémentaires ont été caractérisés. À ce jour, quatre variants d'épissage de la famille de p38-MAPK ont été identifiés : p38 α , p38 β , p38 γ (également appelé ERK6 ou SAPK3) et p38 δ (également appelée SAPK4). Parmi eux, p38 α et p38 β sont exprimés de manière ubiquitaire tandis que

p38 γ et p38 δ sont exprimés différemment selon le type de tissu. Toutes les kinases p38 peuvent être classées par un double motif de phosphorylation Thr-Gly-Tyr (GTY) (Hanks et Hunter 1995). Les comparaisons de séquences ont révélé que chacun des isoformes p38 partage ~60% d'identité mais seulement 40 à 45% avec les autres membres de la famille des MAPKs ([figure 29](#)).

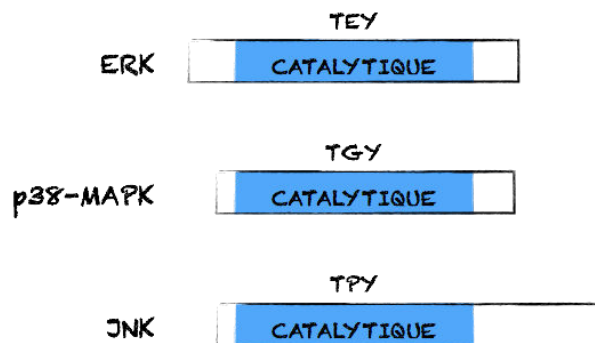


Figure 29. Composition des MAPKs

TEY, Thréonine-Glutamate-Tyrosine ; TGY, Thréonine-Glycine-Tyrosine; TPY, Thréonine-Proline-Tyrosine.

3.2.3.2. Localisation cellulaire

Contrairement à d'autres MAPKs, p38 α n'a pas de signal de localisation nucléaire (SLN). Il a été détecté à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules non stimulées. Sa localisation subcellulaire, lors de son activation, est controversée. Certaines preuves indiquent que p38 α se déplace du cytoplasme vers le noyau (Raingeaud et al. 1995), mais il existe également des preuves montrant qu'en réponse à certains stimuli p38 α s'accumule de préférence dans le cytosol (Ben-Levy et al. 1998). Cette différence pourrait être due aux différentes associations que peut avoir p38 α . Par exemple, la re-localisation de p38 α dans le cytoplasme après son activation a été attribuée à l'exportation nucléaire, lorsqu'elle était associée avec son substrat MAPKAP kinase-2 (Ben-Levy et al. 1998).

3.2.3.3. Activation

3.2.3.3.1. Phosphorylation

L'activation principale des p38-MAPKs se produit par l'intermédiaire d'une double phosphorylation, sur leur motif Thr-Gly-Tyr, par des MAPK kinases (MKK ou MAPKK) (Cohen 1997; Kyriakis et Avruch 2001). Lors de l'activation, p38-MAPK, doublement phosphorylé, change de conformation. Cela modifie l'alignement des deux moitiés de la kinase (domaines N-terminaux et C-terminaux) et améliore l'accès au substrat, augmentant ainsi l'activité enzymatique (Canagarajah et al. 1997; Bellon et al. 1999).

Deux MAPKKs, MKK3 et MKK6, sont des activateurs en amont du groupe p38-MAPK (Dérjard et al. 1995; Han et al. 1996; Raingeaud et al. 1996; Han et al. 1997b). MKK6 peut phosphoryler les quatre membres de la famille p38-MAPK, alors que MKK3 active p38 α , p38 γ et p38 δ mais pas p38 β . Les deux MKK3 et MKK6 sont hautement spécifiques pour p38-MAPK (Enslen et al. 1998; Alonso et al. 2000). L'importance de la fonction physiologique de ces deux kinases provient d'études sur les souris knock-out, dans lesquelles les souris dépourvues conjointement de MKK3 et MKK6 ne sont pas viables (Brancho et al. 2003). Cette observation indique que MKK3 et MKK6 ont des rôles redondants, la perte de l'un ou de l'autre gène permettant d'obtenir des souris saines (Wysk et al. 1999; Lu et al. 1999; Tanaka et al. 2002). L'utilisation de la disruption d'un gène ciblé MKK et les approches ARNsi, ont montré que pour la plupart des stimuli, MKK3 et MKK6 sont les principales MAPKKs activant p38 α (Brancho et al. 2003). La contribution relative des différentes MAPKKs à l'activation de p38 α dépend de la stimulation (Remy et al. 2010), mais aussi du type de cellule, à cause de variations dans les niveaux d'expression des MAPKKs entre les types de cellules (Alonso et al. 2000; Brancho et al. 2003). En outre, plusieurs études, y compris l'analyse génétique chez la souris, ont montré des différences fonctionnelles entre MKK3 et MKK6 (pour revue, voir (Zhang et al. 2007)). Une autre MAPKK, non canonique, a été mise en évidence dans la voie de signalisation dans laquelle l'augmentation du calcium cytosolique conduit à une augmentation de l'expression de PGC-1 α et de la biogenèse mitochondriale, à savoir : CaMKII (Wright et al. 2007a). Cependant, les mécanismes précis sont encore à identifier.

MKK3 et MKK6 sont activées par phosphorylation par une MAPKK kinase (MKKK).

La MKKK responsable de l'activation des voies de p38-MAPK semble être spécifique au type de cellule et de stimulus. Plusieurs MKKKs ont été impliquées dans la régulation de la signalisation de p38-MAPK : MLK, ASK1, TAK1 et certains membres de la famille MEKK (Yamaguchi et al. 1995; Ichijo et al. 1997; Kyriakis et Avruch 2001; Gallo et Johnson 2002; Cheung et al. 2003).

3.2.3.3.2. Autophosphorylation

Trois mécanismes permettent la phosphorylation de p38 : 1) la phosphorylation par les MAPKKs, 2) l'association à TAB1 (TAK1-binding protein) et 3) la régulation négative de la protéine kinase Cdc7.

La voie habituelle d'activation de p38-MAPK implique la phosphorylation de ses résidus thréonine et tyrosine, catalysée par les MAPKKs. Cela induit des changements de conformation améliorant à la fois la liaison à des substrats et l'activité catalytique de p38-MAPK. Cependant, des mécanismes non habituels d'activation de p38 α ont également été décrits.

Une autre voie supplémentaire d'activation de p38 α implique TAB1. Celui-ci peut se lier à p38 α , mais pas à d'autres membres de la famille p38-MAPK, et induit une autophosphorylation de p38 α dans la boucle d'activation (Ge et al. 2002; Zhou et al. 2006). Cette activation indépendante des MAPKKs est obtenue grâce à l'autophosphorylation et l'activation de p38 α après interaction avec TAB1 (Ge et al. 2002). Ce mécanisme semble être impliqué dans l'activation de p38 α par l'AMPK dans les cardiopathies-ischémiques (Li et al. 2005). Curieusement, dans les cardiomyocytes on a observé que bien que TAB1 conduisent à une augmentation de l'activité de p38 α , aucune des activités habituelles en aval de l'enzyme (associée à l'activation de p38 α par les MAPKK) n'ont été observées (Lu et al. 2006). Les auteurs ont constaté que TAB1 séquestre p38 α vers le cytosol et que cela pourrait être un moyen de prévenir certaines fonctions de p38 α activés par les MAPKKs.

Enfin, un troisième mécanisme non-habituel, indépendant des MAPKKs pour l'activation de la p38 α , a été proposé comme opérant sur la régulation négative de la protéine kinase Cdc7. Cela induit une phase S avortée conduisant à l'apoptose médiée par p38 α dans les cellules HeLa. Cependant, le mécanisme sous-jacent n'est pas identifié (Im et Lee 2008).

3.2.3.4. Inhibition

Dans des conditions physiologiques, l'activation des MAPKs est souvent transitoire malgré le niveau de MAPK invariable tout au long de la stimulation. La déphosphorylation semble jouer un rôle majeur dans la régulation négative de l'activité de la kinase. L'ampleur et la durée du signal de transduction de p38-MAPK sont des déterminants essentiels de ses effets biologiques. L'activation transitoire de p38-MAPK se produit en quelques minutes en réponse à la plupart des stimuli. Dans les cellules de mammifères, plusieurs protéines phosphatases interagissent avec p38-MAPK et l'inactivent. A la fois PP2C (Ser/Thr phosphatase) et PTP (Tyr phosphatase) se sont révélées réguler la phosphorylation de p38-MAPK (Takekawa et al. 1998; Takekawa et al. 2000). Par ailleurs, une autre famille de phosphatases à double spécificité joue un rôle clé dans la régulation de ces MAPK, comme M3/6 et MKP7 phosphatases connues pour réguler JNK et p38-MAPK (Keyse 2000; Tanoue et Nishida 2003).

3.2.3.5. Implication dans la biogenèse mitochondriale

Dans le muscle squelettique de rat, l'exercice induit une augmentation concomitante de la phosphorylation de p38-MAPK et des ARNm codant pour le Cyt c et la CS (Wright et al. 2007b). Cela suggère une implication de cette kinase dans la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice. De même, l'augmentation du flux de calcium dans le muscle squelettique de rat avec de la caféine a induit une augmentation de l'expression de Cox-I et des ARNm de la CS (Wright et al. 2007a). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique à p38-MAPK a bloqué cette expression, renforçant le lien entre p38-MAPK et la biogenèse mitochondriale d'exercice. La phosphorylation de p38-MAPK chez l'homme au cours de l'exercice (Widegren et al. 1998), concomitante avec l'augmentation des ARNm de PGC-1 α , suggère que p38-MAPK est impliquée dans la régulation de la biogenèse mitochondriale d'exercice dans le muscle squelettique humain.

3.2.3.5.1. Lien avec PGC-1 α

p38-MAPK a été identifiée comme une kinase pouvant stimuler la transcription du gène PGC-1 α . Tout d'abord, l'utilisation d'un activateur de p38-MAPK (MKK6E) a permis

d'augmenter la quantité de la protéine PGC-1 α dans les cellules humaines de rein BOSC (Puigserver et al. 2001). Ensuite, chez la souris, l'activation de la voie de p38-MAPK a été observée comme concomitante avec l'augmentation des ARNm de PGC-1 α à la suite d'une course sur tapis roulant (Akimoto et al. 2005). Pour finir, dans les cellules C2C12, l'utilisation d'un activateur de p38-MAPK (MKK3E) a permis d'augmenter l'activité du promoteur PGC-1 α . Cette augmentation d'activité a pu être diminuée de ~ 2 fois suite à l'injection d'un inhibiteur spécifique de p38-MAPK (SB203580 ou SB202190) (Akimoto et al. 2005). Ces résultats ont été confortés par l'utilisation d'activateurs de p38 sur un dominant négatif de p38 (p38 non-phosphorylable) qui n'a pas permis augmenter l'activité du promoteur PGC-1 α (Akimoto et al. 2005). Une précision quant à la contribution des différents isoformes de p38-MAPK a été apportée par la suite. Dans le muscle squelettique de souris, le tibial antérieur, seul le dominant négatif de l'isoforme γ a bloqué l'induction de l'expression des ARNm de PGC-1 α suite à la stimulation du nerf moteur (Pogozelski et al. 2009). L'influence de p38-MAPK sur PGC-1 α se fait de façon indirecte, par le biais de facteurs de transcription (ATF-2 et MEF-2), mais aussi de façon directe, par interaction avec la protéine ([figure 30](#)).

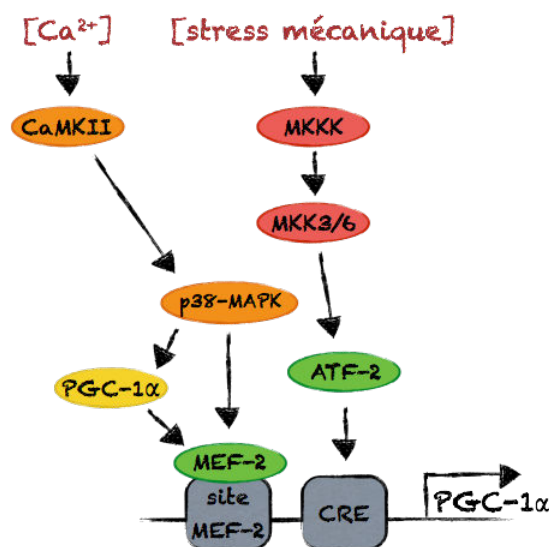


Figure 30. Voie de p38-MAPK.

Comme l'AMPK, p38-MAPK est une kinase qui peut directement phosphoryler la protéine PGC-1 α et moduler son activité (Puigserver et al. 2001). p38-MAPK phosphoryle le co-activateur sur la thréonine-262, la sérine-265 et la thréonine-298, en réponse à la stimulation de cytokines dans les cellules musculaires. L'activation de PGC-1 α par MKK6E,

une kinase de p38-MAPK, a été complètement abrogée par la mutation des trois sites de phosphorylation (rendu non phosphorylable) de PGC-1 α qui sont la cible de p38-MAPK (Puigserver et al. 2001). Le triple mutant PGC-1 α , bien que plus stable avec cette mutation, n'est pas aussi actif en transcription que la protéine qui peut être phosphorylée (Puigserver et al. 2001). Ces événements démontrent que la phosphorylation de p38-MAPK est directement responsable de l'activation de la fonction transcriptionnelle de PGC-1 α . Une expérience pulse-chase, consistant à étiqueter les protéines synthétisées et ainsi suivre leur durée de vie par microscopie, a été conduite sur PGC-1 α dans des cellules BOSC. L'activation de p38-MAPK induite par un activateur (MKKE6), permettant la phosphorylation de PGC-1 α , a multiplié par ~2,8 fois la durée de vie de la protéine PGC-1 α (Puigserver et al. 2001). La phosphorylation de PGC-1 α par p38-MAPK augmente donc la stabilité de la protéine PGC-1 α . Sa demi-vie étant relativement courte (2 ou 3 h), la modulation de sa stabilité constitue un mécanisme important de contrôle de son activité (Knutti et al. 2001; Sano et al. 2007). Enfin, dans les myoblastes, la phosphorylation de PGC-1 α par p38-MAPK permet de supprimer la liaison entre PGC-1 α et p160MBP (p160 myb binding protein), liaison qui agit comme un facteur de répression sur PGC-1 α . Il en résulte une meilleure capacité de transactivation de PGC-1 α (Fan et al. 2004).

3.2.3.5.2. Lien avec ATF-2

Activating transcription factor-2 (ATF-2) a été mis en évidence comme un intermédiaire entre p38-MAPK et le promoteur PGC-1 α . Il est un facteur de transcription, phosphorylé sur ses résidus thréonines 69 et 71, dont l'activité transcriptionnelle est augmentée par p38-MAPK (Abdel-Hafiz et al. 1992; Zhao et al. 1999). ATF-2 est connu pour se lier à l'élément CRE et augmenter l'activité du promoteur par phosphorylation (Livingstone et al. 1995). Le gène PGC-1 α possède un site CRE sur son promoteur (Herzig et al. 2001; Handschin et al. 2003). Comme nous l'avons vu précédemment dans les cellules C2C12, la stimulation de p38-MAPK par un activateur spécifique (MKK3E) augmente l'activité du promoteur du gène PGC-1 α . Cette réponse est amplifiée par une augmentation de l'expression d'ATF-2, et complètement inhibée pour le dominant négatif d'ATF-2 (ATF2 Δ N, domaine d'activation de la phosphorylation dépendante échangées avec le domaine d'activation transcriptionnelle (pour revue, voir Steinmüller et Thiel 2003) ainsi que pour le mutant non phosphorylable (ATF-2 T69A/T71A) (Akimoto et al. 2005). Le rôle

d'intermédiaire indispensable d'ATF-2 dans l'activation du gène PGC-1 α par p38-MAPK a ensuite été confirmé chez la souris. La transfection d'un dominant négatif d'ATF-2 dans le muscle squelettique de la souris a aboli l'augmentation de l'activité du gène PGC-1 α induite par l'activité contractile (Akimoto et al. 2008).

3.2.3.5.3. Lien avec MEF-2

Un autre facteur de transcription a aussi été identifié comme intermédiaire entre p38-MAPK et PGC-1 α : myocyte enhancer factor-2 (MEF-2). Au départ, la phosphorylation de p38-MAPK s'est révélée comme augmentant l'activité transcriptionnelle de MEF-2C en réponse aux lipopolysaccharide (LPS) dans les cellules monocytaires (Han et al. 1997a). MEF-2C est un facteur de transcription de la famille MEF-2 connue pour leur interaction avec les sites MEF-2 présents sur les régions promotrices de certains gènes (Gossett et al. 1989). Le gène PGC-1 α possède un site MEF-2 sur son promoteur (Handschin et al. 2003). p38-MAPK phosphoryle MEF-2C sur les résidus Thr-293, Thr-300 et Ser-387 (Han et al. 1997a). Dans les cellules embryonnaires de rein humain 293 (Human Embryonic Kidney 293, HEK 293 ou 293 cells) l'activation de la voie p38-MAPK augmente l'expression des gènes dépendants de MEF-2C (Zhao et al. 1999), comme cela a été observé dans les cellules monocytaires (Han et al. 1997a). L'observation des quatre autres membres de la famille MEF-2 a révélé une participation de MEF-2A, et non de MEF-2B et MEF-2D (Zhao et al. 1999). Cette participation est bien corrélée avec la phosphorylation in vitro de ces protéines par p38-MAPK (Zhao et al. 1999). Les sites de MEF-2A concernés sont : Thr-312, Thr-319 et Ser-453.

POINTS CLEFS

- Deux stimuli, liés à la contraction musculaire, vont conduire à l'activation de p38-MAPK :
 - le premier signal provient du stress mécanique va passer par des MKKKs puis par MKK3/6,
 - le second est émis par le flux Ca^{2+} cytosolique *via* CaMKII.
 - p38-MAPK activé phosphoryle deux facteurs de transcriptions, ATF-2 et MEF-2, qui vont prendre place sur le promoteur du gène PGC-1 α et induire sa transcription.
 - p38-MAPK phosphoryle les protéines PGC-1 α déjà existantes, ce qui aura pour conséquence d'augmenter la transcription du gène par une boucle d'autorégulation.
-

3.3. Cascade excitation-transcription

L'exercice induit des modifications cellulaires, comme un stress mécanique, des flux de Ca^{2+} cytosolique et une augmentation du rapport AMP/ATP, détectées par les kinases suivantes : p38-MAPK, CaMKII et AMPK. Celles-ci vont activer les protéines et la transcription du gène PGC-1 α . Ce co-activateur va augmenter la transcription des facteurs de transcription nucléaires de la biogenèse mitochondriale, NRFs. NRF-1 et 2 vont induire la transcription des gènes mitochondriaux et du facteur de transcription mitochondrial Tfam qui sera importé dans la mitochondrie. Tfam va induire la transcription des gènes mitochondriaux encodés dans la mitochondrie ([figure 31](#)).

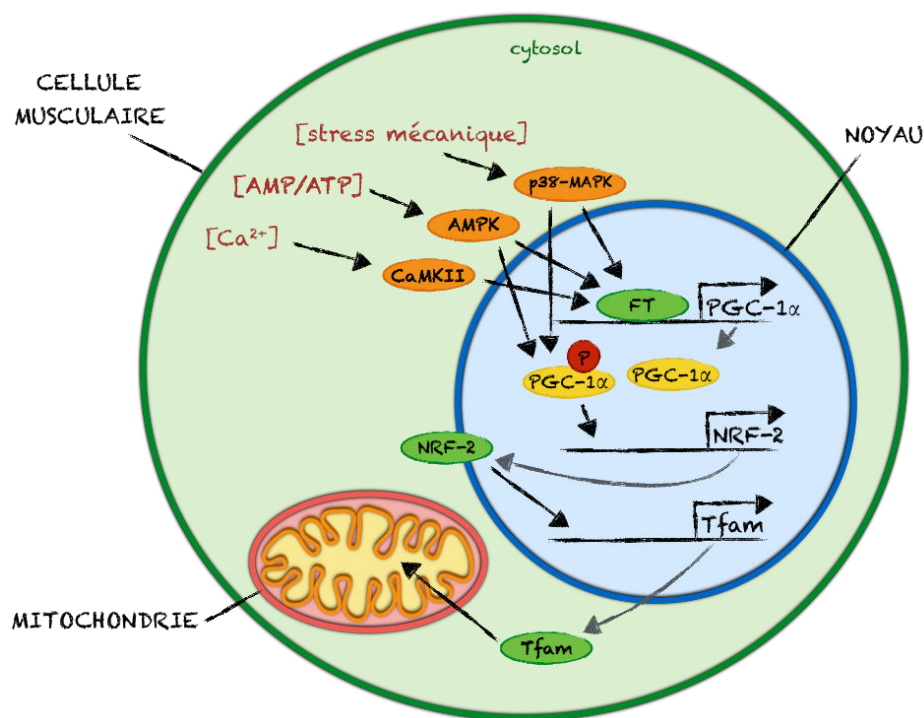


Figure 31. Cascade de la biogenèse mitochondriale

FT, facteur de transcription.

Cette cascade comporte différents niveaux qui suivent un enchaînement particulier et dont l'activation est échelonnée dans le temps. L'augmentation de l'activité des kinases est le premier élément de la chaîne. Celle-ci peut arriver rapidement au cours de l'exercice. Par exemple, l'activité de l'AMPKa2 a été observée après 5 minutes d'effort à 63% $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ (Stephens et al. 2002). L'activité et la phosphorylation des kinases sont la plupart du temps mesurées à l'arrêt de l'exercice pour des raisons méthodologiques et parce qu'elles semblent,

à ce moment là, présenter une activation maximale. Les valeurs sont, pour la majorité d'entre-elles, revenues à leur niveau basal 3 heures après l'arrêt de l'exercice (Egan et al. 2010). L'activation des facteurs et cofacteurs de transcription semblent suivre la même cinétique (Egan et al. 2010).

L'activation des kinases, puis des facteurs et cofacteurs de transcription, vont induire la copie de gènes qui aboutiront à la formation d'ARNm dont la quantité peut être évaluée. Ces transcriptions de gènes pourront conduire à la création de nouvelles protéines. Perry et al. (2010) ont observé l'évolution du contenu en ARNm et en protéine de PGC-1 α au cours d'un entraînement de 2 semaines. Les sujets actifs ont effectué 10 blocs de 4min à 90% $\dot{V}O_{2pic}$, 3 fois par semaine. Les ARNm de PGC-1 α suivaient une hausse transitoire après chaque exercice, de moins en moins importante au fil des séances d'entraînement. Ces augmentations transitoires ont débouché sur une élévation progressive du contenu en protéine de PGC-1 α qui a fini par stagner après 5 séances d'entraînement (Perry et al. 2010) ([figure 32](#)). Cette élévation dans les premières phases de l'entraînement a aussi été observée avec des entraînements continus, 60min à 80% $\dot{V}O_{2pic}$, exécutés chaque jour (Egan et al. 2013).

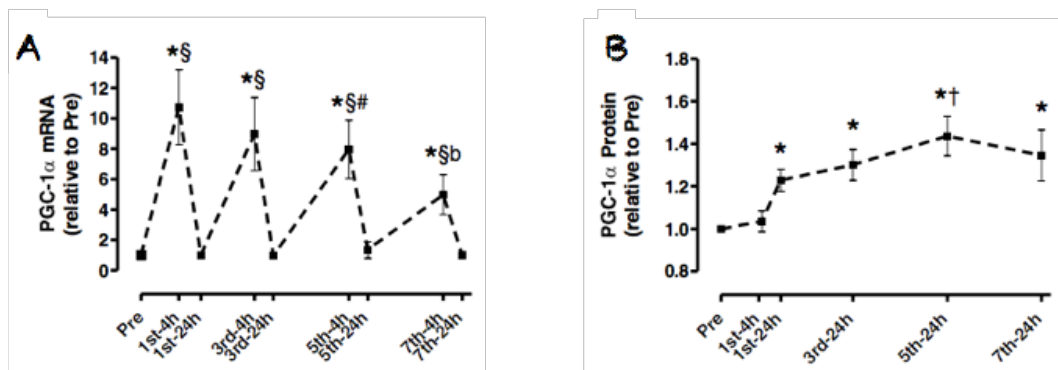


Figure 32. Evolution de l'expression des ARNm et de la protéine PGC-1 α dans le temps. Figures extraites de Perry et al. (2010).

Les protéines constituant la mitochondrie montrent également une augmentation de leur contenu en ARNm suivi d'une augmentation de leur contenu en protéine, sous forme de plateau. Différents timing apparaissent pour ces protéines, allant d'une induction rapide, dès le premier jour pour le Cyt c (Egan et al. 2013), à une augmentation du contenu protéique plus tardif, à 10 jours pour la CS (Perry et al. 2010). La [figure 33](#) présente l'évolution du contenu de Cox-IV (Perry et al. 2010)

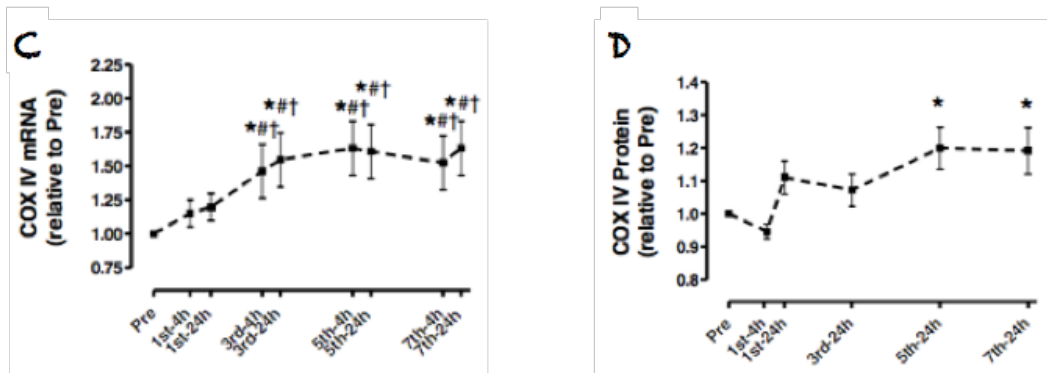


Figure 33. Evolution de l'expression des ARNm et de la protéine Cox-IV dans le temps.
Figures extraites de Perry et al. (2010).

Chez l'animal, des adaptations similaires sont observées (Taylor et al. 2005; Daussin et al. 2012). Une amélioration de l'activité de la CS est mise en évidence aussi bien chez l'homme que chez l'animal, après 3 séances chez l'homme et 5 à 11 jours chez l'animal. L'étude de Daussin et al. (2012) permet d'apporter des informations supplémentaires sur les adaptations fonctionnelles mitochondriales, par le biais de la mesure de la respiration mitochondriale. Après 10 jours, la respiration du complexe I et II montre une amélioration.

3.4. Influence des caractéristiques de l'exercice

Comme nous l'avons vu dans la partie traitant des effets de l'entraînement sur la biogenèse mitochondriale, une grande variété d'exercices a été utilisée, allant d'exercices longs continus de faible intensité à des exercices courts intermittents d'intensité maximale. Au départ, les investigations étaient tournées principalement sur les exercices prolongés. De nos jours, la modalité intermittente avec son intensité plus élevée a été préférentiellement utilisée pour son efficacité supérieure. L'entraînement sous forme de répétition de sprints est connu pour améliorer le potentiel anaérobie, mais il permet également de développer le potentiel aérobie, comme en témoigne les augmentations de la capacité oxydative musculaire (i.e. activité de la CS) (Jacobs et al. 1987), du $\dot{V}O_{2max}$ (MacDougall et al. 1998) et les performances sur un exercice d'endurance (Stepto et al. 1999). Suite à l'importance grandissante des exercices intermittents de haute intensité dans le développement du potentiel aérobie, l'équipe de Gibala s'est intéressée aux adaptations des capacités oxydatives musculaires induites par la répétition de sprints maximaux et aux mécanismes pouvant les expliquer. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ces améliorations : 1) l'intensité de l'exercice, 2) les perturbations cellulaires.

Une première étude a permis de confirmer qu'un entraînement sous forme répétition de sprints maximaux permet d'obtenir des modifications des capacités oxydatives musculaires similaires à un entraînement d'endurance (Gorostiaga et al. 1991), témoigné par l'augmentation de l'activité de la CS. Afin de comparer avec plus de véracité les adaptations induites par ces deux types d'entraînement opposés, Gibala et *al.* (2006) les ont comparés dans une même étude, sur une période de 2 semaines. L'entraînement de répétitions de sprints, malgré un volume et une durée d'entraînement plus faibles, a conduit à l'augmentation similaire des marqueurs de la capacité oxydative musculaire (l'activité enzymatique de Cox et du contenu en protéine de Cox -II et -IV) comparé à l'exercice d'endurance (Gibala et al. 2006). Pour s'assurer que ces adaptations similaires n'étaient pas seulement présentes dans une phase précoce de l'entraînement, une étude avec un protocole d'entraînement plus long (6 semaines) a ensuite été conduite. Les résultats confirment ceux observés dans la première étude, malgré un temps et un volume total d'entraînement respectivement 3 et 10 fois inférieurs. L'entraînement par répétitions de sprints a engendré une augmentation similaire de l'activité de la CS comparativement à l'entraînement continu et long de faible intensité (i.e. 65% $\dot{V}O_{2pic}$) (Burgomaster et al. 2008). Fait intéressant, le niveau du contenu en protéine PGC-1 α , co-activateur majeur de la biogenèse mitochondriale, a été augmenté de façon similaire par les deux types d'entraînement (Burgomaster et al. 2008). Ces résultats permettent d'ouvrir une première piste sur les mécanismes induisant la biogenèse mitochondriale suite à un entraînement sous forme de répétitions de sprints.

Afin de comprendre les mécanismes impliquant des adaptations habituellement induites par des exercices d'endurance, l'équipe de Gibala s'est donc intéressée à la réponse aiguë provoquée par l'exercice de répétitions de sprints. 4 sprints maximaux de 30 secondes ont induit une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK et de p38-MAPK à la fin de l'exercice, ainsi que du contenu en ARNm de PGC-1 α 3h après la fin de l'exercice (Gibala et al. 2009). C'est la stimulation de kinases comme l'AMPK et p38-MAPK qui vont aboutir à la transcription du gène PGC-1 α . La répétition de ce type de séance va donc induire des salves d'ARNm de PGC-1 α qui conduiront à une augmentation du contenu en PGC-1 α comme le montrent les résultats de Burgomaster et *al.* (2008) avec 6 semaines d'entraînement. L'augmentation du contenu en PGC-1 α va favoriser la biogenèse mitochondriale, comme en témoigne l'augmentation de l'activité de la CS, un autre élément observé avec les travaux de Burgomaster et *al.* (2008).

L'exercice sous forme de répétitions de sprints maximaux stimulerait donc de façon aiguë des voies de signalisation (i.e. AMPK, p38-MAPK et PGC-1 α) impliquées dans la biogenèse mitochondriale (Gibala et al. 2009) et induirait, de manière chronique, une augmentation de la biogenèse mitochondriale (i.e. CS et Cox) (Parra et al. 2000; Burgomaster et al. 2005), de façon similaire à un entraînement traditionnel en endurance (Burgomaster et al. 2005). Ces adaptations équivalentes ont été obtenues avec une quantité de travail et une fréquence d'entraînement beaucoup plus faible. Deux éléments, différents entre ces deux types d'entraînement, pourraient expliquer l'efficacité de la répétition de sprints maximaux. Ces deux caractéristiques sont l'intensité et la modalité d'exercice.

3.4.1. Intensité

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'influence de l'intensité sur les adaptations aiguës et chroniques de la biogenèse mitochondriale.

3.4.1.1. Exercice aigu

Sriwijitkamol et *al.* (2007) ont comparé les réponses de 3 populations différentes (sujets obèses diabétiques, obèses non diabétiques, et minces non diabétiques) à la suite de deux exercices aigus. L'objectif était d'évaluer si la réponse des sujets obèses diabétiques était diminuée et d'étudier différentes doses d'exercices. La phosphorylation et l'activité de l'AMPK, ainsi que les ARNm de PGC-1 α et de NRF-1, ont été mesurées à la suite de deux exercices continus de 40min à 50 et 70% $\dot{V}O_{2max}$. Chez le sujet mince non diabétique, la phosphorylation, l'activité de l'AMPK et les ARNm de PGC-1 α ont augmenté à la suite des deux exercices. Aucune différence n'a été notée entre les deux exercices. Du fait que ces deux exercices d'intensité différente ont la même durée, leur quantité totale de travail était différente : 130 et 190kJ respectivement pour les exercices à 50 et 70% $\dot{V}O_{2max}$. Malgré une intensité et une quantité de travail supérieure, l'exercice à 70% $\dot{V}O_{2max}$ n'a pas conduit à une stimulation plus importante. Ce manque de différence pourrait-être dû à une différence trop faible entre les deux exercices pour obtenir une réelle démarcation de réponse entre les deux exercices.

Afin d'isoler les effets de l'intensité sur la réponse aiguë des voies de signalisation de la biogenèse mitochondriale, Egan et *al.* (2010) ont utilisé deux exercices de dépense

énergétique égale. Le choix d'intensités de 40 et 80% $\dot{V}O_{2pic}$ permet d'avoir une démarcation entre les deux exercices. Ces exercices ont duré 69 et 36min, respectivement pour le 40 et 80% $\dot{V}O_{2pic}$, pour atteindre tout deux la cible de 400kJ. L'exercice de haute intensité a induit une augmentation plus importante du contenu en ARNm de PGC-1 α , avec des valeurs 4 et 10 fois supérieures aux mesures pré-exercice, respectivement pour l'exercice à 40 et 80%WR $_{pic}$. Ces différences s'expliquent par une sollicitation différente des voies de signalisation en amont de PGC-1 α . En effet, la phosphorylation de l'AMPK et de CaMKII a été plus importante après l'exercice le plus intense. Cette différence est aussi observée pour les facteurs de transcription ATF-2 et HDAC interagissant avec le gène PGC-1 α . L'activation de p38-MAPK et CREB n'a cependant pas été influencée par l'intensité de l'exercice. Cette étude permet donc de mettre en évidence un effet de l'intensité de l'exercice différent selon les voies de stimulation de la biogenèse mitochondriale, avec une stimulation de la transcription de PGC-1 α plus importante pour les hautes intensités.

La comparaison d'exercices réalisés à différentes intensités est cependant à relativiser (Godin et al. 2010). En effet, le recrutement des fibres musculaires pendant l'exercice est dépendant de l'intensité : les fibres de type I sont principalement recrutées lors d'exercices à faible intensité (<40% $\dot{V}O_{2pic}$) tandis que l'intensité croissante mène à un recrutement plus important de fibres de type II (Sale 1987). Cela peut expliquer, en partie, les différences signalées entre les deux intensités d'exercice utilisées. En effet, la sensibilité des fibres de type II semble être plus importante en ce qui concerne la phosphorylation de l'AMPK (Lee-Young et al. 2009), l'augmentation des ARNm et de la protéine PGC-1 α (Russell et al. 2003; Jensen et al. 2012).

La réponse aiguë a elle aussi été étudiée sur des exercices intermittents, comprenant 4 blocs de 4 min entrecoupés de 3 min de récupération, à deux intensités différentes : 70 et 85% $\dot{V}O_{2pic}$ (Nordsborg et al. 2010). Les ARNm de PGC-1 α ont été mesurés à +0h, +1h, +3h et +5h après l'arrêt de l'exercice. Pour l'exercice à 85% $\dot{V}O_{2pic}$, sur les 4 points de mesure post exercice, les ARNm de PGC-1 α sont supérieurs à la mesure pré-exercice. Seul le point +3h est différent de la mesure pré-exercice pour l'exercice à 70% $\dot{V}O_{2pic}$. Une tendance ($P = 0.069$) pour une évolution plus importante de la réponse, en fonction du temps (+3h), a été observée pour l'exercice à 85% $\dot{V}O_{2pic}$. Pour réduire la variabilité, l'expression des ARNm pour les échantillons obtenus 1, 3, et 5h après l'exercice a été moyennée. Cette analyse révèle

une réponse supérieure de l'exercice à $85\%\dot{V}O_{2pic}$. Cette réponse supérieure non franche de l'exercice à une intensité plus élevée peut s'expliquer par une faible différence d'intensité entre les deux exercices. Cependant, l'exercice effectué à intensité supérieure comporte une quantité de travail supérieure (kJ), ce qui joue en faveur d'une réponse plus importante.

Edgett et *al.* (2013) se sont aussi intéressés aux effets de l'intensité de l'exercice sur l'induction des ARNm de PGC-1 α sur un exercice intermittent. Chacune des 3 modalités consistait à réaliser des blocs de 1min de pédalage sur 1min de récupération. Dans cette étude, la quantité totale de travail a été ajustée pour les 3 exercices. Les 3 intensités étaient de 73, 100 et 133%WR_{pic} et possédaient donc respectivement 11, 9 et 7 répétitions pour atteindre la même dépense énergétique cible de 730 kJ. Les 3 intensités ont abouti à des niveaux d'ARNm de PGC-1 α post exercice 4, 9 et 4 fois supérieurs aux valeurs pré-exercice, respectivement pour les exercices à 73, 100 et 133%WR_{pic}. Cependant, lorsque ces réponses ont été rapportées au niveau d'activation musculaire, à l'aide d'un électro-myogramme, les exercices réalisés à 73 et 100%WR_{pic} n'apparaissaient plus différents et supérieurs au 133%WR_{pic}. Ces résultats suggèrent que les augmentations des ARNm de PGC-1 α sont en grande partie attribuables à l'augmentation du recrutement musculaire. Cependant, au-delà d'une certaine intensité, la réponse apparaît éteinte.

3.4.1.2. Exercices chroniques

Les effets chroniques de l'intensité d'exercice sur la biogenèse mitochondriale ont aussi été explorés, sur une seule étude pour le moment (Boyd et al. 2013). Les sujets ont suivi un protocole de 9 séances d'entraînement, sur 3 semaines (3 entraînements par semaine). L'exercice consistait à réaliser 8 à 19 répétitions de 1min de travail sur 1 min de récupération, à 70% ou 100%, respectivement pour le groupe LO et HI. Malgré une intensité et une quantité de travail totale supérieures pour l'exercice à 100%, les deux groupes ont présenté des augmentations similaires du contenu en protéines PGC-1 α , Cox -I et -IV. Le fait que ces sujets soient en surpoids ou obèses ne permet pas d'expliquer cette absence de différence. En effet, les niveaux basaux de PGC-1 α (Holloway et al. 2008) et la réponse d'induction du gène avec l'exercice (Sriwijitkamol et al. 2007) ne diffèrent pas entre des individus minces et obèses. Il se peut néanmoins qu'une induction similaire d'ARNm de PGC-1 α n'induisse pas la même production de la protéine.

En résumé, l'ensemble de ces études suggère que l'influence de l'intensité de l'exercice, sur la réponse aiguë, semble être attribuable à la quantité de fibres musculaires recrutées (Edgett et al. 2013), ainsi qu'à l'implication des fibres de type IIa dont la sensibilité est supérieure aux fibres I et IIx (Godin et al. 2010). Cependant, au-delà d'une certaine intensité, la réponse apparaît émoussée (Edgett et al. 2013), probablement en raison d'une évolution de l'exercice vers une spécificité différente. Malgré une réponse aiguë influencée par l'intensité de l'exercice, les adaptations chroniques ne semblent pas l'être (Boyd et al. 2013). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider cette question importante. Le [tableau 3](#) regroupe l'ensemble des études discutées précédemment.

Tableau 3. Effet de l'intensité de l'exercice sur la biogenèse mitochondriale

Référence	Sujets	Exercice	Résultats
Sriwijitkamol et al. (2007)	8 sujets (5 h et 3 f) 45ans ; BMI : 25,5 $\dot{V}O_{2max} = 21 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	IF : 40min à 50% IM : 40min à 70%	pAMPK (+3.5x, MO) activité de AMPK α 2 (+, LO; +3.4x, MO) PGC-1 α ARNm (+, LO; +, MO) Pas de différence entre les intensités ?
Egan et al. (2010)	8 hommes 24ans, 179cm, 80kg $\dot{V}O_{2pic} = 40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	IF : 69min à 40% $\dot{V}O_{2pic}$ IH : 36min à 80% $\dot{V}O_{2pic}$ DE = 400kcal	pAMPK (+2.8x), pCaMKII (+84%), pATF-2 (+2.4x), pHDAC (+2x) pour HI (>LO) p38-MAPK (+2x), CREB (+80%) pour LO et HI PGC-1 α ARNm (4x, LO; 10x, HI) avec une différence entre les deux
Nordsborg et al. (2010)	10 hommes 28ans, 178cm, 71kg $\dot{V}O_{2max} = 55 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	4 x 4min / 3min repos IF : 70% $\dot{V}O_{2pic}$ IH : 85% $\dot{V}O_{2pic}$	PGC-1 α mRNA (+3x, 70%; +4.5x, 85%) Avec une tendance à la différence (P= 0.069)
Edgett et al. (2013)	8 hommes 22ans, 182cm, 77kg $\dot{V}O_{2pic} = 53 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	1 min / 1min loadless 11 rép à 73%WR $_{pic}$ 9 rép à 100%WR $_{pic}$ 7 rép à 133%WR $_{pic}$ DE = 730 kJ	Expression absolue : PGC-1 α ARNm (+4, 9 et 4x) Expression relative à l'activation musculaire : 133% < 73 et 100%
Boyd et al. (2013)	19 hommes (surpoids/obèse) 23ans, 182cm, 14kg ; BMI : 32 $\dot{V}O_{2pic} = 35 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	3 semaines, 9 sessions 8-10 x 60s / 60s loadless IF: 70%PMA IH: 100%PMA	PGC-1 α (+23%) Cox -I (+14%) et -IV (+18%) Activité de la CS (+11%)

Abréviations : IF, faible intensité ; IM, intensité moyenne ; IH, haute intensité ; DE, dépense énergétique ; rép, répétition ; PMA, puissance maximale aérobie ; +, augmentation.

3.4.2. Modalité

Dans ce manuscrit, la modalité correspond à la manière dont est effectué l'exercice : il peut être sous forme continu (avec une charge constante) ou sous forme intermittente (avec une charge variable). Dans ce point, nous allons investiguer les effets aigus et chroniques de la modalité sur les voies de signalisations impliquées dans la biogenèse mitochondriale ([tableau 4](#)).

L'équipe de Gibala s'est intéressée à l'implication de la nature intermittente de la répétition de sprints maximaux sur la biogenèse mitochondriale. Afin de répondre à cette question, Cochran et *al.* (2014) ont comparé les réponses aiguës de 4 répétitions de sprints maximaux de 30s avec celles d'un exercice iso-calorique continu de 4min à intensité maximale. Les deux modalités d'exercice ont induit une augmentation de la phosphorylation de p38-MAPK, d'un substrat de l'AMPK (ACC) et des ARN messagers de PGC-1 α , sans se différencier l'une de l'autre. Malgré une quantité totale de travail identique, ces deux exercices ne diffèrent pas uniquement sur leur modalité (intermittente vs. continue). En effet, la durée de pédalage (2 vs. 4min, respectivement pour l'intermittent et le continu) et la puissance moyenne (557 vs. 281W, respectivement pour l'intermittent et le continu) n'étaient pas la même entre les deux exercices. Il est donc difficile de statuer sur l'implication de la modalité d'exercice dans ces réponses. L'intensité la plus importante a pu avantager l'exercice intermittent, tandis que la durée d'exercice a pu jouer en faveur de l'exercice continu, conduisant à des stimulations équivalentes.

Après avoir observé la réponse aiguë sur les deux modalités, une deuxième étude a été conduite pour investiguer la réponse chronique de l'exercice continu. Cet entraînement de 18 sessions sur 6 semaines (3 jours par semaine) n'a pas induit d'augmentation de l'activité de la CS ni des complexes de la chaîne respiratoire, à l'exception de Cox-IV (+20%) (Cochran et *al.* 2014). Pourtant, Burgomaster et *al.* (2008) avaient obtenu, dans une étude antérieure, une augmentation de l'activité de la CS de ~30% avec des répétitions de sprints pour une même organisation de l'entraînement (i.e. 6 semaines, 3 jours par semaine). Seulement 6 sessions sur 2 semaines avaient permis à la modalité intermittente d'augmenter l'activité de la CS et de Cox-II. Une étude chronique avec ces deux types d'exercice apparaît nécessaire pour tirer des conclusions plus fortes. Néanmoins, le fait de comparer deux exercices dont l'intensité est différente risque de biaiser les conclusions attendues sur les effets de la nature intermittente

(cf. paragraphe précédent). Ces résultats suggèrent que pour une même dépense énergétique, l'utilisation de la modalité intermittente, incluant une intensité d'exercice élevée, permet d'obtenir des adaptations chroniques plus importantes.

D'autres études ont utilisé des modalités différentes, pour étudier l'effet de la quantité de travail réalisé (Malek et al. 2013) ou de l'équivalence de travail (intensité moyenne et quantité totale similaire) (Gorostiaga et al. 1991; Wang et al. 2009; Wang et Sahlin 2011; Bartlett et al. 2012). Dans chacun de ces 5 cas, le temps de travail, la dépense énergétique et l'intensité moyenne étaient similaires. Leurs résultats ont montré des adaptations, aiguës et chroniques, similaires pour les deux modalités d'exercices. Ces adaptations concernaient : la phosphorylation de l'AMPK et p38-MAPK, le contenu en ARNm et en protéine de PGC-1 α ainsi que l'activité de la CS. Prenons l'exemple de l'étude de Bartlett et *al.* (2012) qui a comparé deux exercices de modalité différentes sur tapis roulant, l'exercice intermittent à haute intensité (une alternance d'effort de 50 à 90% $\dot{V}O_{2max}$) et l'exercice continu à faible intensité (70% $\dot{V}O_{2max}$). Ces deux exercices ont duré 50 min, à une intensité moyenne de 70%, et les sujets ont parcouru une distance similaire. Les résultats de ces 5 études suggèrent que la dépense énergétique, le temps de travail et l'intensité moyenne sont les éléments déterminants pour stimuler et induire la biogenèse mitochondriale. En effet, les exercices opposés dans ces études montrent les mêmes adaptations et ont une dépense énergétique, un temps de travail et une intensité moyenne similaires. Cependant, l'étude de Daussin et *al.* (2008) qui a utilisé la même configuration et s'est intéressé à la capacité oxydative mitochondriale du muscle squelettique, mesurée par la respiration mitochondriale, a montré une amélioration supérieure pour l'exercice intermittent comparé à l'exercice continu. Cette adaptation supérieure pour l'exercice intermittent, malgré une dépense énergétique totale et une durée similaire, suggère un effet bénéfique de l'alternance de charge. Néanmoins, il n'est toujours pas possible de conclure sur les effets de la modalité, de part l'implication de l'intensité d'exercice dans les adaptations mitochondriales.

Tableau 4. Effet de la modalité d'exercice sur la signalisation

Référence	Sujets	Exercice	Résultats
Burgomaster et al. (2005)	8 sujets (6 h et 2 f) 22ans, 180cm, 84kg $\dot{V}O_{2pic} = 44.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	2 semaines, 1-2 jr repos, 6 sessions 4-7 x 30s « all-out » / 4min	Activité de la CS (+38%)
Gibala et al. (2006)	16 hommes 22ans, 183cm, 80kg $\dot{V}O_{2pic} = 50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	14 jours, 6 sessions EI = 4-6 x 30s « all-out » / 4min EC = 90-120 min à 65% $\dot{V}O_{2pic}$	Activité de Cox (+) Contenu en protéine de Cox -II et -IV (+) => Pas de différence entre les modalités
Burgomaster et al. (2008)	20 sujets (10 h et 10 f) 24ans, 173cm, 72kg $\dot{V}O_{2pic} = 41 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	6 semaines, 3jr/sem (SIT) ou 5jr/sem (ET) EI = 4-6 x 30s sprint EC = 40-60min à 65% $\dot{V}O_{2pic}$	Contenu en protéine de PGC-1 α (+2x) Activité de la CS (+) => Pas de différence entre les modalités
Gibala et al. (2009)	6 hommes 23ans, 78kg $\dot{V}O_{2pic} = 47.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	4 x 30s all-out / 4min	pAMPK α -1 et -2 (+), pACC (+) et pp38-MAPK (+) ; pCaMKII (inchangé) PGC-1 α ARNm (+2x)
Cochran et al. (2014)	9 sujets (5 h et 4 f) 22ans, 78kg, 173cm $\dot{V}O_{2pic} = 47 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	Aigu : INT = 4 x 30s « all-out » / 4min repos (= 2min) CON = 4min « all-out » Chronique : EC = 6 semaines, 3jr/sem	pp38-MAPK (+), pACC (+) et PGC-1 α ARNm (+4x) => Augmentations similaires Activité de la CS, et contenu en protéine Cox-IV inchangé
Gorostiaga et al. (1991)	12 sujets (3 h et 9 f) 27ans, 75kg $\dot{V}O_{2max} = 37 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	8 semaines, 3jr/sem, 30min EC = 50%PMA EI = 30s à 100%PMA / 30s repos	Activité de la CS (+25%) pour CT
Wang et al. (2009)	9 sujets (7 h et 2 f) 26ans, 174cm, 72kg $\dot{V}O_{2max} = 40.9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	CON = 90 à 67% $\dot{V}O_{2max}$ INT = 180 x (12s à 120% $\dot{V}O_{2max}$ / 18s à 20% $\dot{V}O_{2max}$) => même durée (90min) et travail total	PGC-1 α ARNm (+10-13x) pas de différence entre les modalités ARNm de Tfam, TFAM et NRF-2 augmentés pour CON ARNm NRF-2 supérieurs pour CON

Référence	Sujets	Exercice	Résultats
Wang et Sahlin (2011)	7 sujets (6 h et 1 f) 27ans, 175cm, 75kg $\dot{V}O_{2max} = 40.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	CON = 90min à 60% $\dot{V}O_{2max}$ INT = 180 x (12s à 120% $\dot{V}O_{2max}$ / 18s à 20% $\dot{V}O_{2max}$) => même durée (90min) et travail total	ARNm de PGC-1 α (+5-8x) Pas de différence entre les modalités
Bartlett et al. (2012)	10 hommes 20ans, 177cm, 73kg $\dot{V}O_{2max} = 52 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	INT = 6 x (3min à 90%PMA / 3min à 50%PMA) CON = 50min à 70%PMA => même intensité moyenne, durée et travail réalisé	pAMPK (+1.5x) pp38-MAPK (+1.9x, HIT; +1.5x, CON) pp53 (+2.7x, HIT; +2.1x, CON) ARNm de PGC-1 α (+4.2x, HIT; +4.5x, CON) Pas de différence entre les modalités

Abréviations : h, homme ; f, femme ; EL, entraînement intermittent ; EC, entraînement continu ; INT, exercice intermittent ; CON, exercice continu ; CS, citrate synthase ; Cox, complexe IV.

POINTS CLEFS

- L'exercice induit des modifications intracellulaires (rapport AMP/ATP, flux de Ca^{2+} cytosolique, stress mécanique, etc.) qui vont activer différentes voies de signalisation et conduire à la création de nouvelles protéines.
 - L'intensité de l'exercice est un élément déterminant dans les réponses cellulaires.
 - La modalité de l'exercice semble aussi jouer un rôle dans l'activation des voies de signalisation de la biogenèse mitochondriale.
-

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

A ce jour, trois hypothèses sont avancées pour expliquer les améliorations obtenues avec l'exercice intermittent: 1) le temps passé au/ou près du $\dot{V}O_{2max}$, 2) l'intensité de l'exercice, et 3) les perturbations cellulaires.

Une plus grande quantité de temps passé au/ou près du $\dot{V}O_{2max}$ permet de développer les processus physiologiques et les structures qui limitent le $\dot{V}O_{2max}$. Par conséquent, c'est une stratégie efficace pour améliorer la capacité aérobie des personnes (Midgley et al. 2006; Macpherson et al. 2011). Des études récentes ont rapporté des améliorations plus importantes du $\dot{V}O_{2max}$ chez les cyclistes après un entraînement construit pour passer plus de temps près du $\dot{V}O_{2max}$ (Rønnestad et Hansen 2013; Rønnestad et al. 2014).

L'intensité de l'exercice est reconnue pour influencer les voies de signalisation (Egan et al. 2010) et améliorer les performances (Stepto et al. 1999). D'autres recherches doivent être effectuées pour confirmer que l'activation supérieure des voies de signalisations, induite par l'augmentation de l'intensité, se traduit par des adaptations mitochondriales plus importantes.

Concernant l'influence des perturbations cellulaires, plusieurs pistes suggèrent leur implication mais aucune étude n'a pu apporter de conclusions claires sur leur rôle. La comparaison de modalités d'exercice différentes (continue vs. intermittente) a toujours été réalisée avec des intensités différentes. Sachant que l'intensité est un élément influençant l'activation des voies de signalisation, il n'est pas possible de conclure sur l'implication de la modalité d'exercice dans les adaptations. Lors d'un exercice, les perturbations s'observent pendant les transitions, au début et à la fin de chaque répétition, et se caractérisent par des changements rapides de vitesses de réactions enzymatiques. A l'aide d'une modélisation mathématique, basée sur les connaissances du métabolisme énergétique musculaire squelettique, Li et *al.* (2009) ont quantifié les facteurs clés régulant le métabolisme énergétique du muscle squelettique pendant la transition du repos à l'exercice, à différentes intensités d'exercice. À 60% du $\dot{V}O_{2max}$, l'état redox cytosolique ($NADH/NAD^+$) augmente pour atteindre un pic 2 min après le début de l'exercice, pour ensuite diminuer progressivement. Une diminution concomitante de 50% du rapport ATP:ADP a été observée au début de l'exercice, pour augmenter ensuite progressivement et se stabiliser à 75% des

valeurs de repos après 15 min d'exercice. Ce modèle suggère que l'homéostasie cellulaire est clairement plus perturbée dans les premières minutes d'exercice. Cependant, l'influence des perturbations métaboliques n'a pas encore été démontrée et j'ai donc choisi d'orienter mes travaux sur ce thème. Afin de caractériser l'implication des perturbations métaboliques dans la stimulation des voies de signalisation de la biogenèse mitochondriale, nous avons comparé l'influence de deux modalités d'exercice, réalisées à une même intensité, sur ces voies de signalisation. La différence principale entre les deux exercices avec cette méthodologie réside dans les variations répétées du métabolisme induites par l'exercice intermittent.

Afin de répondre à notre problématique, nous avons mis en place deux études. La première devait aussi nous permettre de choisir le protocole intermittent le plus adapté pour notre seconde étude.

Les objectifs poursuivis par la première étude étaient :

- a) d'identifier la durée du cycle travail:repos qui induit les perturbations métaboliques les plus importantes,
- b) de vérifier que l'exercice intermittent n'entraînait pas une modification du recrutement du type des fibres musculaires,
- c) de comparer les réponses physiologiques entre un exercice continu et un exercice intermittent de même intensité et de même durée de pédalage (variations, temps passé à une haute intensité et concentration de lactate sanguin).

Les hypothèses étaient les suivantes :

- 1) la durée du cycle influence les perturbations métaboliques.
- 2) l'exercice intermittent n'entraîne pas de modification dans le recrutement du type de fibres musculaires.
- 3) les réponses métaboliques diffèrent avec la modification de la modalité d'exercice.

La seconde étude visait à déterminer l'influence de la répétition des perturbations métaboliques sur des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale.

Les objectifs étaient :

- a) d'évaluer les perturbations métaboliques induites par les deux modalités d'exercice,
- b) de caractériser l'influence de la répétition des perturbations métaboliques sur les voies de l'AMPK, CaMKII et p38-MAPK.

Les hypothèses étaient les suivantes :

- 1) la modalité d'exercice intermittente induit davantage de perturbations métaboliques,
- 2) les perturbations métaboliques induites par la modalité intermittente (supérieures à la modalité continue) stimulent de manière plus importante les voies de signalisation situées en amont de PGC-1 α .

MATERIELS ET METHODES

Les deux protocoles ont été réalisés à l'université de Brighton et approuvés par le comité d'éthique de l'Université. Ces études ont été menées conformément à la Déclaration d'Helsinki. Tous les sujets ont été informés sur le déroulement et les risques du protocole avant de signer un consentement éclairé préalablement à leur participation.

1. Protocole 1

1.1. Sujets

Dix hommes volontaires, sains et actifs, ont participé à ce protocole (moyenne \pm ET : 24 \pm 5 ans ; 74 \pm 11 kg ; 1,79 \pm 0,06 m ; 13,9 \pm 3,1 % masse grasse ; $\dot{V}O_{2pic}$, 42 \pm 7 mL \cdot min⁻¹ \cdot kg⁻¹). Ils ont maintenu leur régime alimentaire habituel durant le protocole et se sont abstenus de consommer de la caféine et de l'alcool pendant les 48h précédant chaque visite.

1.2. Schéma général du protocole

Sept jours après un test incrémental, les participants ont réalisés 4 exercices aigus séparés par un minimum de 48 heures et effectués dans un ordre randomisé. Ces exercices consistaient en 30 minutes de pédalage à 70%WR_{pic} suivant différentes modalités : 1) 30min d'exercice continu, 2) 60 x 30s:30s, 3) 30 x 60s:60s, et 4) 15 x 120s:120s. Les sujets ont effectué un échauffement normalisé de 10min à 40%WR_{pic}, suivi d'une période de repos de 5min ([figure 34](#)).

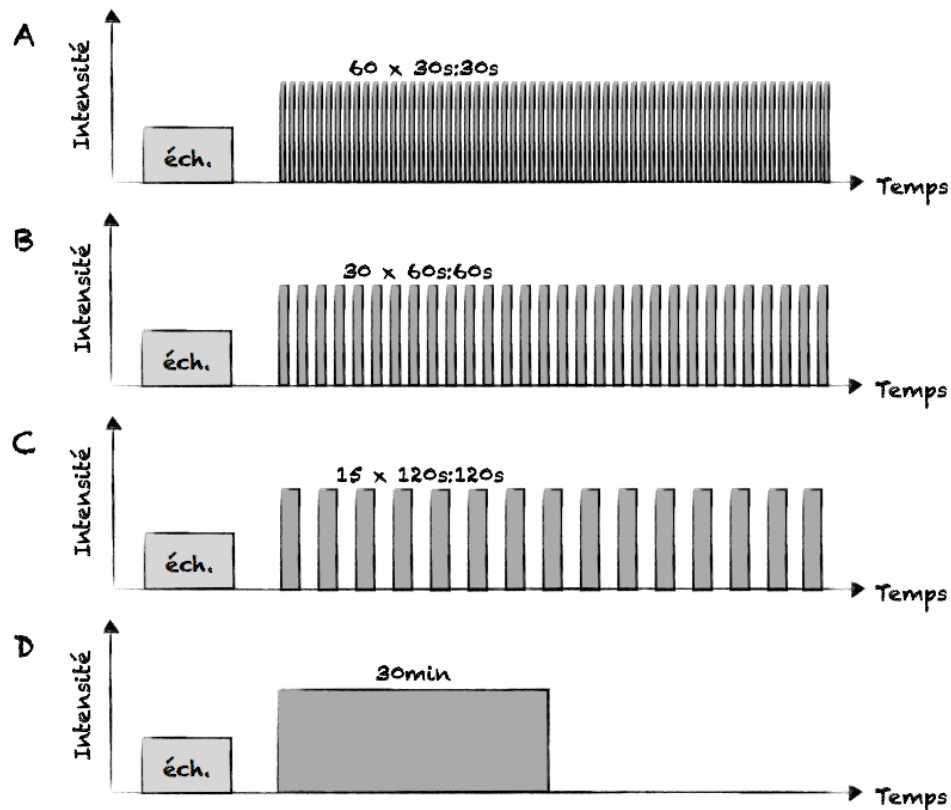


Figure 34. Exercices du protocole 1

(A) 60 x 30s:30s, (B) 30 x 60s:60s, (C) 15 x 120s:120s et (D) 30min. éch, échauffement.

Ce protocole a été mis en place pour la réalisation de nos deux études. La première dont le but était d'identifier la durée du cycle induisant les perturbations métaboliques les plus importantes en s'appuyant sur les 3 exercices intermittents. La seconde étude consistait à caractériser les différences entre la modalité continue et intermittente, par le biais de l'exercice continu et de l'exercice intermittent de cycle 60s:60s.

1.3. Critères d'inclusion

Nous avons retenu des sujets majeurs, de sexe masculin, dont l'âge n'excédait pas 35 ans, et sans contre-indication médicale à la pratique sportive.

1.4. Test et essais

1.4.1. Test incrémental

Le test, sur ergocycle, a débuté par un palier de 3 min à 75 watts suivi par une incrémentation de 25 watts toutes les 2 min jusqu'à épuisement (figure 35). Chaque sujet a effectué un effort maximal, en accord avec les critères de Howley et *al.* (1995). L'objectif était de déterminer le $\dot{V}O_{2pic}$ et le WR_{pic} pour caractériser les sujets et individualiser l'intensité des exercices.

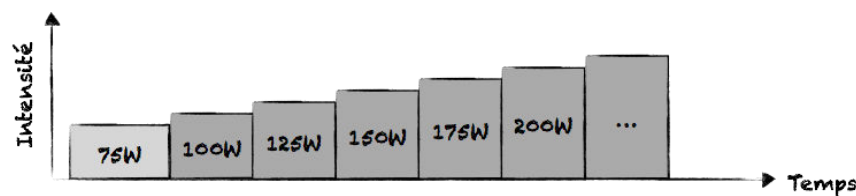


Figure 35. Test incrémental

Après un échauffement réalisé à 75W, la puissance était augmentée de 25W toutes les 2 minutes jusqu'à épuisement des sujets. W, watts.

1.4.2. Protocole des exercices

Les exercices, réalisés à 70% WR_{pic} , ont été précédés par une période d'échauffement de 10 minutes à 40% WR_{pic} suivie d'une période de récupération passive de 5 min. Il a été demandé aux sujets de maintenir une fréquence de pédalage de 70 tours par minute. Les exercices intermittents ont tous duré 1h et ont suivi un rapport travail:récupération de 1:1, avec une récupération passive. Tous les exercices ont consisté en 30min de pédalage. Au cours de ces exercices, la consommation d'oxygène, l'oxygénation musculaire et l'activité électrique du muscle ont été enregistrées en continu.

2. Protocole 2

2.1. Sujets

Neuf hommes volontaires, sains et actifs, ont participé à ce protocole (âge: 22 ± 5 ans ; masse: 74 ± 11 kg ; taille : $1,79 \pm 0,04$ m ; $\dot{V}O_{2pic}$, 44 ± 6 mL·min⁻¹·kg⁻¹). Ils ont été invités à

poursuivre leur entraînement habituel tout au long de l'étude, à ne pas consommer d'alcool et de caféine pendant au moins 48h avant toutes les séances de test, ainsi qu'à reproduire le même régime alimentaire pendant les 24 heures précédant chaque évaluation.

2.2. Schéma général du protocole

Sept jours avant le premier essai expérimental, tous les participants ont effectué un test d'effort incrémental. Les essais expérimentaux ont consisté en deux exercices aigus réalisés dans un ordre aléatoire, séparés d'une semaine : un exercice de modalité continue (CON) et un exercice de modalité intermittente (INT). Des biopsies musculaires ont été effectuées, au niveau du *vastus lateralis*, avant et après l'exercice, pour chaque modalité, sur une jambe différente pour les deux visites.

2.3. Critères d'inclusion

Nous avons retenu des sujets majeurs, de sexe masculin, dont l'âge n'excédait pas 35 ans, et sans contre-indication médicale à la pratique sportive.

2.4. Test et essais

2.4.1. Test incrémental

Les participants ont effectué un test d'effort incrémental similaire au protocole 1 pour individualiser l'intensité d'exercice.

2.4.2. Protocole des exercices

Les deux exercices consistaient en 30 min de pédalage à $70\%WR_{pic}$ dans une modalité continue (CON) ou intermittente (INT). L'exercice intermittent était constitué de 30 périodes de 2 minutes composées de 1 minute de travail alternée avec 1min de récupération passive ([figure 36](#)). Il a été demandé aux sujets de maintenir une fréquence de pédalage de 75 tours par minute durant les deux exercices.

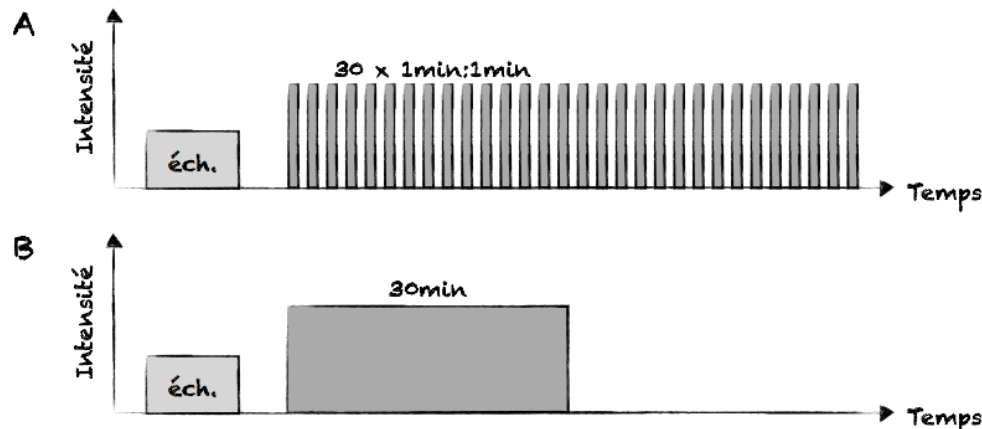


Figure 36. Exercices du protocole 2

(A) 30 x 1min:1min et (B) 30min. L'intensité d'exercice est identique pour les deux modalités (70% de la puissance maximale aérobie. éch, échauffement.

Le jour de chaque essai, les sujets sont arrivés au laboratoire dans la matinée, 60-90 min après l'ingestion de leur petit-déjeuner habituel. Un échantillon de muscle au repos (R) a été prélevé à partir du *vastus lateralis*, immédiatement congelé dans de l'azote liquide, et stocké à -80°C jusqu'à son analyse. Après une période de repos de 10 minutes, les sujets ont effectué un échauffement normalisé de 10min à 40%WR_{pic}, suivi d'une période de repos de 5min. Ensuite, les participants ont réalisé la modalité d'exercice désignée. Des biopsies musculaires ont été obtenues immédiatement après la cessation de l'exercice (+0h) et 3h après l'exercice (+3h). Les sujets se reposaient dans le laboratoire jusqu'à la dernière biopsie, et n'étaient autorisés à ne consommer que de l'eau *ad libitum*.

3. Appareils et analyses

3.1. Puissance et fréquence de pédalage

Le test incrémental a été réalisé sur un ergocycle équipé d'un frein électrique (Schoberer Rad Messtechnik avec 8 jauges de contrainte, SRM, Allemagne) et les exercices continus et intermittents ont été effectués sur un ergocycle (620 Ergomedic ; Monark, Varberg, Suède) équipé de manivelles de mesure de puissance (Pro Track, 8 ; SRM). La puissance mécanique de sortie et la fréquence de pédalage ont été enregistrées en continu à l'aide d'un dispositif d'enregistrement SRM (SRM Power Control V). Le travail total pour chaque exercice a été déterminé et exprimé en kJ.

3.2. Echanges gazeux

Les échanges gazeux pulmonaires ont été enregistrés cycle par cycle en utilisant un système d'analyse de gaz (MediSoft, Allemagne). Les valeurs aberrantes ont été enlevées selon Lamarra *et al.* (1987) et le signal a été interpolé à 1 sec d'intervalle, puis moyenné sur des périodes de 5 sec. Les valeurs de consommation d'oxygène ont été utilisées pour déterminer les variables suivantes :

- la consommation d'O₂ cumulée au cours de la période d'exercice (L),
- le $\dot{V}O_2$ moyen (L·min⁻¹) au cours de la période d'exercice,

Pour l'étude 1 :

- la somme des amplitudes entre les points hauts et bas du $\dot{V}O_2$ (L·min⁻¹) pour chaque cycle sur la période d'exercice ($\Sigma\Delta\dot{V}O_2$),
- la durée pendant laquelle le taux d'augmentation du $\dot{V}O_2$ ($+d\dot{V}O_2 \cdot dt^{-1}$) était supérieure à 20 mL·sec⁻¹ ($T\dot{V}O_{2RR}$) ; le choix de la limite de 20 mL·sec⁻¹ était arbitraire, mais les résultats étaient similaires sur une plage de 5 à 60 mL·sec⁻¹ ; et
- l'indice de fluctuation du $\dot{V}O_2$ (IFO), calculé à partir des trois variables caractérisant la fluctuation du $\dot{V}O_2$ (amplitude, taux d'augmentation et durée du cycle, voir l'équation 1).

$$\text{Equation 1 : Index de fluctuation du } \dot{V}O_2 \text{ (IFO en mL}^2\cdot\text{sec}^{-3}\text{)} = \frac{A \cdot RR_{moy}}{T}$$

où A est l'amplitude moyenne des oscillations du $\dot{V}O_2$ sur l'exercice en mL·sec⁻¹, RR_{moy} est le taux d'augmentation moyen du $\dot{V}O_2$ ($+d\dot{V}O_2 \cdot dt^{-1}$) pendant l'exercice en mL·sec⁻¹ et T est la durée du cycle en secondes.

Pour l'étude 2 et 3 :

- le temps passé à une intensité supérieure à 90% du $\dot{V}O_2$ cible pour l'intensité 70%WR_{pic}, déterminé à partir de la relation $\dot{V}O_2$ –puissance de l'exercice incrémental ;
- l'amplitude (A, en L·min⁻¹) au cours de la période d'exercice qui correspond à la somme des deltas positifs ;
- la dérivée moyenne (RR_{moy}, en mL·sec⁻²), calculée par la division de l'amplitude totale par la durée pendant laquelle le signal augmente ; et
- l'indice de fluctuation calculé à partir des deux variables caractérisant la fluctuation du

$\dot{V}O_2$ (amplitude et dérivée moyenne, voir l'équation 2).

Equation 2 : Index de fluctuation du $\dot{V}O_2$ (IFO, en $\text{mL}^2 \cdot \text{sec}^{-3}$) = $A \cdot \text{RR}_{\text{moy}}$

où A est l'amplitude du $\dot{V}O_2$ sur l'exercice et RR_{moy} est la dérivée moyenne du $\dot{V}O_2$ pendant l'exercice.

3.3. Concentrations sanguines en lactate

Des tubes capillaires de verre ont été utilisés pour recueillir 50 μl de sang (D957G-70-35 ; Clinitubes, Radiometer, Copenhagen, Danemark) prélevés au bout du doigt. Lors de l'évaluation incrémentale, des échantillons de sang capillaire ont été prélevés au repos, immédiatement à la fin de l'exercice et 3 min après la fin de l'exercice. Pour les exercices intermittents, des échantillons de sang capillaires ont été pris au repos, après l'échauffement, à 30 min et immédiatement à la fin de l'exercice. La concentration sanguine en lactate ($[\text{La}]_s$) a été déterminée en utilisant un instrument Yellow Springs (YSI 2300 Stat Plus ; Analox, Sheffield, Royaume-Uni). L'analyseur a été étalonné régulièrement en utilisant des normes de précision et régulièrement évalué par des contrôles de qualité externes.

3.4. Perception de l'effort

La perception de l'effort (RPE, rate of perceived exertion) a été mesurée en utilisant l'échelle de Borg à 20 catégories (Borg 1982), qui se compose de 15 états marqués de 6 à 20 points (de rien à maximal). La RPE a été prise à la fin de chaque palier au cours de l'exercice incrémental, et à la fin de l'échauffement et de l'exercice intermittent.

3.5. Fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque a été mesurée continuellement pendant chaque exercice (RS 800, Polar, Kempele, Finland).

3.6. Electromyographie (EMG)

L'activité électrique du *vastus lateralis* (VL) et du *vastus medialis* (VM) du quadriceps de la jambe gauche ont été enregistrées avec deux paires d'électrodes de surface (diamètre 15

mm et distance inter-électrode de 30 mm) connectées à un électromyographe. La peau a été préalablement rasée, abrasée avec du papier émeri et nettoyée avec de l'alcool pour réduire l'impédance de la peau. Les électrodes ont été placées à 80% de la distance de la ligne reliant l'épine iliaque antéro-supérieure et l'espace articulaire en face de la frontière antérieure du ligament médial pour le VM, et à 2/3 de la distance de la ligne entre l'épine iliaque antéro-supérieure et la frontière latérale de la rotule pour le VL (Hermens et al. 2000). L'électrode de référence a été positionnée sur l'épine iliaque antéro-supérieure. La position des électrodes a été marquée à l'encre indélébile pour assurer un placement identique lors des visites ultérieures.

Les signaux électromyographiques ont été amplifiés (gain, 1000), filtrés (fréquence de bande passante, de 10 Hz à 1 kHz) et enregistrés (fréquence d'échantillonnage, 4 kHz) à l'aide d'un boîtier d'acquisition (PowerLab 16/30 - ML880 / P; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australie) et son logiciel associé (LabChart 7, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australie). Les calculs ont été effectués sur 4 séries de 30 bouffées EMG, à la première minute puis respectivement toutes les 10 et 20 min pour l'exercice continu et intermittent. La racine carrée de la moyenne (RMS, Root-mean-square) a été calculée. La fréquence moyenne (MPF, mean power frequency) a été déterminée par analyse spectrale du signal et permet de renseigner sur l'évolution du recrutement musculaire.

La moyenne des bouffées a été retenue pour chacune des deux mesures. Les calculs ont été réalisés à l'aide d'une macro (ADInstruments, Labchart 8.1). Les valeurs ont été exprimées en % de la contraction maximale volontaire mesurée avant l'effort, dans une position assise avec un angle jambe-cuisse de 90 degrés.

3.7. Spectroscopie du proche infra-rouge (NIRS)

La NIRS mesure, de façon non invasive, l'évolution de l'oxygénation tissulaire à l'aide de l'émission et de la réception d'une lumière dans le spectre du proche infrarouge à la surface de la peau. La concentration tissulaire en oxyhémoglobine (HbO₂) et désoxyhémoglobine (HHb) est estimée grâce à la différence d'intensité lumineuse (absorption et la diffusion des photons). Le choix des longueurs d'ondes infrarouges autour de 780 et 850 nm correspond à l'absorption majoritaire respective d'HHb et d'HbO₂.

Les sujets ont été équipés d'une sonde NIRS pour enregistrer l'absorption de la lumière à travers les tissus musculaires tout au long de l'épreuve d'effort (PortaMon, Artemis Medical Systems, Hollande). La paire émetteur-détecteur a été placée sur le ventre du muscle *vastus lateralis* de la cuisse droite, à mi-chemin entre l'épicondyle et le grand trochanter du fémur. Le tissu adipeux empêche une quantité substantielle de lumière de passer dans le tissu musculaire. Afin de limiter l'influence du tissu adipeux sur nos mesures, nous nous sommes assurés que le pli cutané du *vastus lateralis* était inférieur à 1,5 cm (Van Beekvelt et al. 2001). Ce système dispose de trois émetteurs émettant pour chacun d'eux deux longueurs d'onde de 760 et 850 nm, et d'un photorécepteur. Les distances émetteur/récepteur sont respectivement de 30, 35, et 40mm. Les paramètres déterminés avec la NIRS sont : 1) l'oxyhémoglobine HbO_2 (Unité arbitraire U.A.), 2) la désoxyhémoglobine HHb (U.A.), 3) la quantité d'hémoglobine totale Hb_{tot} ($Hb_{tot} = HbO_2 + HHb$).

Le signal a été moyenné sur des périodes de 5 sec. Les valeurs de HHb ont été utilisées pour déterminer les variables suivantes : 1) le temps passé à une intensité supérieure à 80%max de la valeur maximale observée au cours de ces exercices, 2) l'amplitude (A, en U.A.) au cours de la période d'exercice qui correspond à la somme des deltas positifs, 3) la dérivée moyenne (RRmoy, en U.A.:sec⁻¹), calculée par la division de l'amplitude totale par la durée pendant laquelle le signal augmente, et 4) l'indice de fluctuation calculé à partir des deux variables caractérisant la fluctuation de HHb (amplitude et dérivée moyenne, voir l'équation 2).

Equation 2 : Index de fluctuation de HHb (IFH, en U.A.:sec⁻¹) = $A \cdot RR_{moy}$

où A est l'amplitude de HHb sur l'exercice (U.A.) et RRmoy est la dérivée moyenne de HHb pendant l'exercice (U.A.:sec⁻¹).

3.8. Biopsies musculaires

Chaque biopsie musculaire a été prélevée sur le muscle *vastus lateralis* dans des conditions stériles et sous anesthésie locale. Une zone de la peau et les tissus sous-jacents ont été anesthésiés avec 1ml de lidocaïne 2%, et une petite incision (0,5 cm) a été faite dans le but d'obtenir un échantillon de tissu. Une incision fraîche a été réalisée pour chacune des trois biopsies, au moins 2 cm à partir d'un site de biopsie précédent.

3.9. Western blot

Les échantillons de muscle congelés ont été homogénéisés et les protéines ont été séparées en utilisant des mini-gels préfabriqués à 7,5% (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free, Biorad, Hercules, CA) par une migration de 40min à 200V constant (Mini-PROTEAN Tetra cell and PowerPac Basic power supply, Hercules, CA). Les échantillons issus des deux modalités pour chaque sujet (continue ou intermittente et pré, +0h et +3h après l'exercice) ont été chargés sur le même gel. Après l'électrophorèse, la quantification des protéines totales a été déterminée pour normaliser les résultats (pour revue, voir McDonough et al. 2015). Les protéines du gel ont été transférées sur une membrane en nitrocellulose de 0,2µm avec un kit de transfert (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, Hercules, CA) pendant 10 min à un courant constant de 2,5A avec une limite supérieure de 25V. Les liaisons non spécifiques ont été bloquées en plaçant la membrane dans du lait 5%/TBS-T (10 mmol·l⁻¹ Tris pH 7.5, 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20) pendant 2 h à température ambiante. Les membranes ont été incubées toute la nuit avec un anticorps primaire : phospho-AMPKα Thr-172 (#2531), AMPKα 23A3 (#2603), phospho-CaMKII Thr286 (#3361), CaMKII pan (#3362), phospho-p38-MAPK Thr180 / Tyr182 (#9211) et p38-MAPK (#9212) (1: 1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Les membranes ont été lavées dans du TBS-t et incubées avec un anticorps secondaire approprié (#7074, 1:3000 ; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Les bandes d'intérêt ont été visualisées par chimiluminescence amplifiée (ECL ; GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA) et quantifiées par densitométrie (GS800 Calibré Imaging densitomètre, Bio-Rad, Hercules, CA). Pour chacune des protéines d'intérêt, le ratio quantité de protéines phosphorylées sur quantité totale de protéines a été réalisé.

4. Analyses statistiques

Les données sont présentées comme moyenne ± ET. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statistica 6 (StatSoft, France). La normalité a été testée avec le test Kolmogorov-Smirnov. Le niveau de significativité a été défini à $p < 0,05$.

4.1. Etude 1

Une analyse de variance (ANOVA) à 2 voies avec mesures répétées, suivie d'un test de Tukey post-hoc, ont été utilisés pour examiner l'influence de la durée du cycle et de l'effet

temps sur les mesures de $[La]_s$ et de RPE. Une ANOVA à 1 voie, suivie d'un test Tukey post-hoc en cas de significativité, ont été utilisés pour examiner l'effet du temps spécifique à chaque modalité (1h d'exercice) sur les paramètres du $\dot{V}O_2$ suivant : 1) amplitude, 2) points bas, et 3) points hauts. Une ANOVA à 1 voie, suivie d'un test Tukey post-hoc en cas de significativité, ont également été utilisés pour évaluer l'effet de la durée du cycle (30s:30s, 60s:60s et 120s:120s) sur la quantité totale de travail (kJ) et les paramètres du $\dot{V}O_2$ suivant : 1) consommation totale, 2) consommation moyenne, 3) points bas moyen, 4) points hauts moyen, 5) amplitude moyenne, 6) $\Sigma\Delta\dot{V}O_2$, 7) $T\dot{V}O_{2RR}$, et 8) IFO.

4.2. Etude 2

Une ANOVA à 2 voies avec mesures répétées suivie d'un test de Tukey post-hoc ont été utilisés pour examiner l'effet de la modalité et du temps sur les mesures de RPE, de RMS, de MPF et pour les mesures de $[La]_s$. Une ANOVA à 1 voie, suivie d'un test Tukey post-hoc, ont été utilisés, pour examiner l'effet du temps (1h d'exercice) sur les mesures de $[La]_s$ pour l'exercice intermittent. La même démarche a été utilisée pour identifier la présence d'une dérive des signaux de $\dot{V}O_2$ et d'HHb sur les deux exercices. Le test t de Student pour échantillons appariés a été utilisé pour comparer les deux modalités sur les paramètres suivants : 1) travail total, 2) consommation d' O_2 totale, 3) $\dot{V}O_2$ moyen, 3) temps passé à un $\dot{V}O_2 > 90\% \dot{V}O_2$ cible, 4) amplitude du $\dot{V}O_2$, 5) dérivée moyenne du $\dot{V}O_2$, 6) OFI, 7) temps passé à une HHb $> 80\% \dot{V}O_2$ cible, 8) amplitude de HHb, 9) dérivée moyenne de HHb, et 10) IFH.

4.3. Etude 3

Une ANOVA à 2 voies avec mesures répétées et un test de Tukey post-hoc ont été utilisés pour examiner l'influence de la modalité et de l'effet temps sur l'activation des kinases (AMPK, p38-MAPK et CamKII). Le test t de Student pour échantillons appariés a été utilisé pour comparer les deux modalités sur les paramètres suivants : 1) travail total, 2) consommation d' O_2 totale, et 3) OFI.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude 1

L'objectif de l'étude 1 était d'identifier la durée d'intervalle de travail qui permettait la perturbation métabolique la plus importante. Les sujets ont effectué 3 exercices intermittents en alternant des périodes d'effort à 70%WR_{pic} avec des périodes de récupération passive : 1) 60 x 30s:30s, 2) 30 x 60s:60s et 3) 15 x 120s:120s.

1.1. Résultats

Dépense énergétique

Aucune différence n'a été observée entre les trois exercices intermittents pour la quantité totale de travail (en kJ : 344 ± 33 , 345 ± 34 et 343 ± 35 , respectivement pour le 30s:30s, 60s:60s et 120s:120s), la consommation d'O₂ totale (O₂ en L : 91 ± 11 , 87 ± 15 et 91 ± 10 , respectivement pour le 30s:30s, 60s:60s et 120s:120s) et le $\dot{V}O_2$ moyen (en L·min⁻¹: $1,51 \pm 0,19$, $1,45 \pm 0,25$ et $1,51 \pm 0,17$, respectivement pour le 30s:30s, 60s:60s et 120s:120s).

Variations métaboliques

L'inspection des réponses représentatives du $\dot{V}O_2$ a révélé des oscillations systématiques synchronisées avec les périodes de travail et de repos sur toute la durée d'exercice. Dans l'ensemble, les profils de réponse étaient similaires pour tous les sujets. Elles étaient à la fois plus amples et plus largement espacées lorsque la durée de cycle était plus longue ([figure 37](#)).

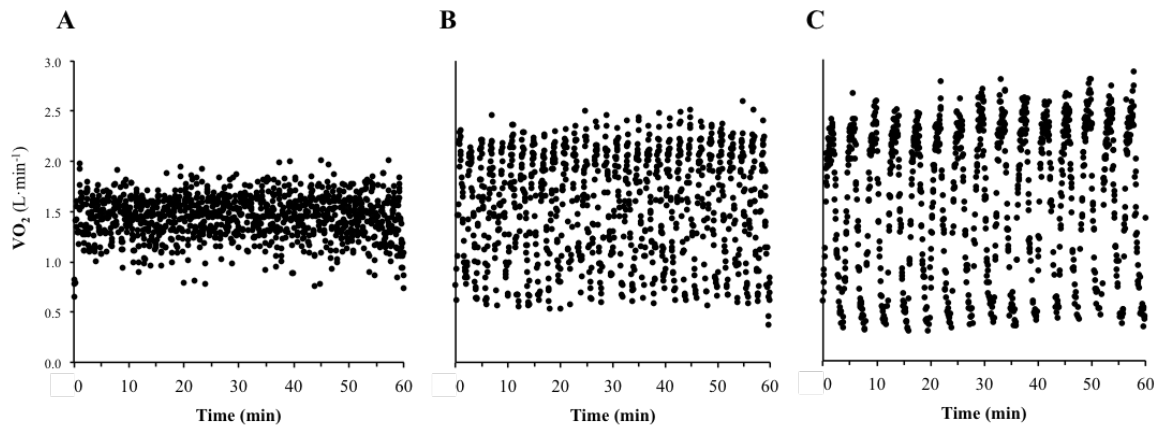


Figure 37. Réponses représentatives de $\dot{V}O_2$

Réponse représentative (sujet 10) de la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$) cycle par cycle pour les exercices (A) 30s:30s, (B) 60s:60s et (C) 120s:120s.

L'analyse des oscillations du $\dot{V}O_2$ a révélé que la durée du cycle influait sur l'amplitude entre les points bas et haut. Les pics et les points bas des oscillations du $\dot{V}O_2$ ont augmenté au cours des premiers cycles jusqu'à ce que les valeurs restent inchangées. L'amplitude moyenne entre le pic au point le plus bas et le plus haut augmentait avec la durée du cycle (O_2 en L : $0,63 \pm 0,10$, $1,48 \pm 0,24$ et $2,13 \pm 0,19$ respectivement pour 30s:30s, 60s:60s et 120s:120s, $P < 0,05$). Cette amplitude est demeurée constante à partir de la seconde répétition pour les exercices 60s:60s et 30s:30s et à partir de la première répétition pour l'exercice 120s:120s ($P < 0,05$). Le pic d'oscillation du $\dot{V}O_2$ a été influencé par la durée cycle ($P < 0,05$). Les valeurs moyennes ont atteint $60 \pm 8\%$ du $\dot{V}O_{2\text{pic}}$ pour l'exercice 30s:30s, $72 \pm 9\%$ au cours de l'exercice 60s:60s et $84 \pm 11\%$ au cours de l'exercice 120s:120s ($P < 0,05$) ([tableau 5](#)).

Tableau 5. Réponses moyennes des trois exercices intermittents (70% du taux de travail maximal, 3 durées de cycle travail sur repos de ratio 1:1).

		30s:30s	60s:60s	120s:120s
Pic de $\dot{V}O_2$	Absolu ($L \cdot \min^{-1}$)	$1,825 \pm 0,227$	$2,204 \pm 0,348^*$	$2,589 \pm 0,242^{* \#}$
	Relatif ($\% \dot{V}O_{2\max}$)	60 ± 8	$72 \pm 9^*$	$86 \pm 11^{* \#}$
$\dot{V}O_2$ point bas	Absolu ($L \cdot \min^{-1}$)	$1,211 \pm 0,182$	$0,727 \pm 0,157^*$	$0,453 \pm 0,093^{* \#}$
	Relatif ($\% \dot{V}O_{2\text{pic}}$)	40 ± 5	$24 \pm 5^*$	$15 \pm 3^{* \#}$
Amplitude d'oscillation de la $\dot{V}O_2$ ($L \cdot \min^{-1}$)		$0,629 \pm 0,100$	$1,477 \pm 0,242^*$	$2,133 \pm 0,186^{* \#}$
$\dot{V}O_2$ moyenne ($L \cdot \min^{-1}$)		$1,511 \pm 0,190$	$1,449 \pm 0,251$	$1,511 \pm 0,173$

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. * Significativement différent de 30s:30s ($p < 0,05$), [#] Différent de 60s:60s ($p < 0,05$) ; $n = 10$ pour chaque groupe.

La plus grande amplitude et le plus haut pourcentage de $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ ont été observés pour l'exercice 120s:120s mais le nombre de transition du repos au travail était inférieur dans l'heure d'exercice (15 répétitions vs. 30 et 60 respectivement pour 60s:60s et 30s:30s). La $\Sigma \Delta \dot{V}O_2$ était plus élevée dans l'exercice 60s:60s ($+38 \pm 13\%$ et $+19 \pm 18\%$ respectivement par rapport à 120s:120s et 30s:30 ; $P < 0,05$). Le $T\dot{V}O_{2RR}$ était également plus élevé pour l'exercice 60s:60s comparé à l'exercice 30s:30s ($+58 \pm 42\%$, $P < 0,05$) et la différence était proche d'être significative par rapport à l'exercice 120s:120s ($+13 \pm 16\%$, $p = 0,08$). L'IFO était plus important pour l'exercice 60s:60s ($41 \pm 29\%$ et $67 \pm 62\%$ respectivement par rapport au 120s:120s et 30s:30s ; $P < 0,05$) ([figure 38](#)).

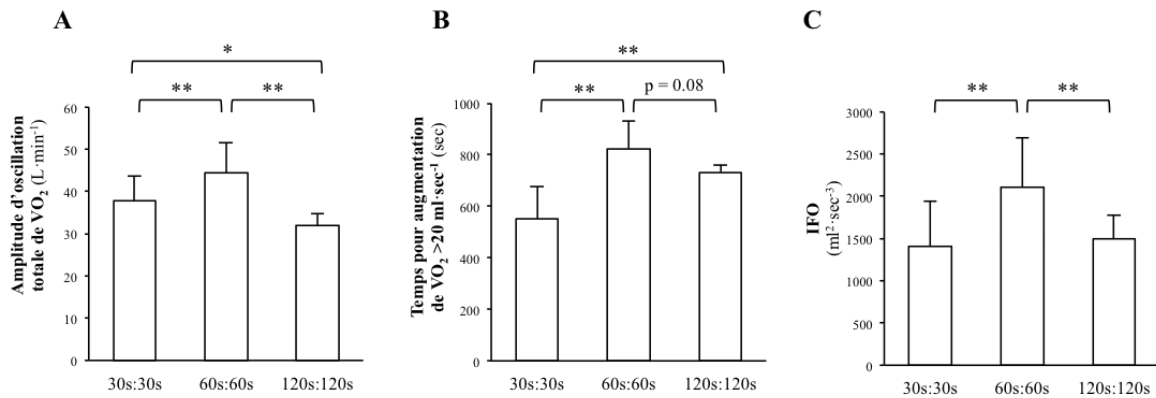


Figure 38. Quantification des fluctuations du $\dot{V}O_2$

Effet de la durée du cycle (30s:30s, 60s:60s et 120s:120s) sur (A) l'amplitude d'oscillation totale de la $\dot{V}O_2$, (B) le temps passé à un taux d'augmentation de la $\dot{V}O_2$ supérieur à $20 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$, (C) l'Index de Fluctuation de l'Oxygène (IFO). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$; $n = 10$ pour chaque groupe.

Concentrations sanguines en lactate et RPE

La concentration en La_s à 30 minutes et à la fin de l'exercice, était plus élevée pendant l'exercice 120s:120s par rapport aux exercices 30s:30s et 60s:60s ($P < 0,05$). Aucune différence n'a été observée entre 30 min et la fin de l'exercice, suggérant ainsi la présence d'un état stable de lactatémie. La perception de l'effort était plus élevée pour le 120s:120s par rapport aux 30s:30s et 60s:60s ($P < 0,05$) ([tableau 6](#)).

Tableau 6. Concentration de lactate sanguin et échelle de Borg de perception de l'effort (RPE) durant les 3 exercices intermittents (70% du taux de travail maximal, durées de cycle travail sur repos de ratio 1:1).

Condition	30s:30s	60s:60s	120s:120s
Concentration de lactate sanguin (mM)			
Repos	1,73 ± 0,47	1,14 ± 0,33	1,34 ± 0,49
30-min	1,80 ± 0,76	2,28 ± 0,98	3,54 ± 1,79* [#]
Fin	1,73 ± 0,63	1,97 ± 0,82	3,72 ± 1,65* [#]
RPE			
Echauffement	9 ± 2	9 ± 2	9 ± 2
Fin	12 ± 2*	13 ± 1*	14 ± 1* [#]

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET. * Significativement différent du repos (concentration de lactate sanguin) ou de l'échauffement (RPE) ($p < 0,05$), [#] Différent de 30s:30s et 60s:60s ($p < 0,05$) ; $n = 10$ pour chaque groupe.

1.2. Discussion

La présente étude a comparé les fluctuations du $\dot{V}O_2$ lors d'exercices intermittents, dont la durée du cycle effort:repos était différente, mais présentant une même quantité totale de travail. L'objectif était d'identifier la durée de cycle induisant les plus hautes fluctuations du $\dot{V}O_2$ à l'aide d'une nouvelle méthodologie pour quantifier ces fluctuations du $\dot{V}O_2$. La modalité 60s:60s a induit les plus grandes fluctuations du $\dot{V}O_2$, comme illustré par des valeurs supérieures pour la somme des amplitudes point bas-point haut du $\dot{V}O_2$ sur l'exercice, le taux d'augmentation du $\dot{V}O_2$ pendant les oscillations et l'IFO.

Oscillations $\dot{V}O_2$

Dans le cadre de la modélisation de la cinétique du $\dot{V}O_2$, l'intensité utilisée dans notre étude (70%WR_{pic}) est considérée comme une haute intensité (Rossiter 2011). Un exercice continu, réalisé à une haute intensité, est associé à une composante lente du $\dot{V}O_2$ dans un délai de 90 à 180s. Cette composante lente peut également se développer au cours d'exercices intermittents. Dans une étude précédente, Turner et al. (2006) ont observé une composante lente lors d'exercices intermittents basés sur des cycles de 60s:120s et 90s:120s. Dans notre

étude, toutes les variables quantifiées (ex : point bas, point haut et amplitude du $\dot{V}O_2$) n'ont pas évolué après le premier cycle de l'exercice. Comparé à l'étude précédente, la principale différence est une intensité plus faible dans notre étude ($70\%WR_{pic}$ vs. $120\%WR_{pic}$). De plus, aucune différence de lactatémie n'a été observée entre la 30^{ème} minute et la fin de l'exercice. C'est probablement en raison de la faible intensité ($70\%WR_{pic}$) et de la durée des cycles choisie que les oscillations du $\dot{V}O_2$ n'ont pas augmenté au fil du temps et qu'aucune composante lente ne se soit développée.

L'analyse des réponses du $\dot{V}O_2$ a révélé que les fluctuations du $\dot{V}O_2$ étaient spécifiques à chaque durée de cycle. L'exercice de cycles 30s:30s a été caractérisé par une amplitude inférieure par rapport aux deux autres modalités. Une durée de 30 secondes ne semble pas assez longue pour que la réponse du $\dot{V}O_2$ atteigne un état d'équilibre au cours de la période de travail, effectuée à 70% de WR_{pic} , et retrouve sa valeur basale lors de la période de récupération.

L'analyse de la durée de cycle 60s:60s a révélé que ce laps de temps produisait les plus grandes fluctuations du $\dot{V}O_2$. Une période de travail et de repos de 60 secondes permettait au $\dot{V}O_2$ d'approcher un état d'équilibre au cours de la période de travail et de récupération. La durée de cycle 120s:120s produisait les plus larges amplitude de $\dot{V}O_2$. Cependant, cette configuration conduisait à un état stable au cours de la période de travail, réduisant la durée pendant laquelle des variations métaboliques étaient observées. Ainsi, l'amplitude cumulée des fluctuations du $\dot{V}O_2$ était moindre au cours de la modalité de 60s:60s. Ces résultats sont en ligne avec les études antérieures (Turner et al. 2006; Skiba et al. 2014) et confirment que l'amplitude d'oscillation du $\dot{V}O_2$ est directement liée à la durée du cycle de travail et du rapport travail:repos.

Contrôle du $\dot{V}O_2$

Pendant l'exercice, la production mitochondriale d'ATP est stimulée pour s'adapter à la demande. Le contrôle de la cinétique du $\dot{V}O_2$ est proposé comme étant une boucle de rétroaction linéaire simple, médiée par l'ADP, qui dépend largement de la concentration en PCr (Meyer 1988). Par conséquent, la relation entre la [PCr] et le $\dot{V}O_2$ devrait être essentiellement linéaire jusqu'au $\dot{V}O_{2max}$ et le taux d'augmentation du $\dot{V}O_2$ serait toujours

semblable, indépendamment du $\dot{V}O_2$ de départ. Cependant, dans un modèle canin, Wust et al. (2014) ont rapporté des cinétiques sigmoïdales $[ADP]-\dot{V}O_2$, suggérant qu'un simple mécanisme de rétroaction de l'ADP ne suffit pas à expliquer l'ajustement du $\dot{V}O_2$ pendant l'exercice. La production d'ATP, dans la cellule musculaire, se produit en réponse à une augmentation d'[ADP] et de [Pi] (Glancy et al. 2008). Tous les systèmes tendent spontanément vers un état d'équilibre, cet état étant plus stable. Par conséquent, la capacité d'un système à fournir un travail utile diminue à mesure que ce système se rapproche de son état d'équilibre. Commencer un travail à partir d'un $\dot{V}O_2$ plus élevé serait associé à un $\Delta GATP$ moins négatif et se traduirait par une cinétique d'ajustement plus lente. Ainsi pour une même demande métabolique (i.e. $70\%WR_{pic}$), la vitesse à laquelle la consommation d'oxygène va atteindre l'état stable dépend de la différence entre le $\dot{V}O_2$ de départ et le $\dot{V}O_2$ requis pour l'état stable. Plus la différence de $\dot{V}O_2$ sera faible et plus la cinétique d'ajustement sera lente. Dans notre étude, les vitesses à laquelle varie le $\dot{V}O_2$ sont spécifiques à la durée du cycle, et le temps passé à un taux de $\dot{V}O_2$ supérieur à $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ était de 9,2, 27,5 et 48,8-sec par cycle, respectivement pour les modalités 30s:30s, 60s:60s et 120s:120s. De plus, le $\dot{V}O_2$ au début de la période de travail était plus élevé pour la modalité 30s:30s par rapport à la modalité 60s:60s et 120s:120s. Ces données sont en ligne avec les études antérieures qui observaient un ralentissement de la cinétique du $\dot{V}O_2$ lorsque l'exercice était initié depuis un $\dot{V}O_2$ plus élevé (Brittain et al. 2001; Bowen et al. 2011; Wust et al. 2014). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que le taux de montée du $\dot{V}O_2$ est directement influencé par le $\dot{V}O_2$ du début de chaque reprise de répétition. Toutefois, les données humaines, d'expériences basées sur l'analyse de la cinétique du $\dot{V}O_2$ depuis des $\dot{V}O_2$ différentes, montrent des résultats contradictoires : un état énergétique intracellulaire réduit, en soi, coïncide (Bowen et al. 2011) ou ne coïncide pas (DiMenna et al. 2010) avec un ralentissement des cinétiques du $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice à partir de taux métaboliques plus élevés. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la contribution des différents facteurs contrôlant la cinétique du $\dot{V}O_2$ pendant l'exercice *in vivo*.

Considération pratiques

Les sujets de notre étude présentaient des $\dot{V}O_{2max}$ allant de 34 à $54 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, caractéristiques de sujets actifs. Il est établi que la capacité aérobie peut influencer la

cinétique du $\dot{V}O_2$. Les sujets entraînés en endurance et les athlètes de haut niveau se caractérisent par des cinétiques rapides du $\dot{V}O_2$ (<30s) qui contrastent avec celles observées chez les personnes âgées et les personnes déconditionnées pour un exercice identique (>40s, (Rossiter 2011)). Pour l'exercice modéré, la cinétique du $\dot{V}O_2$ s'accélère lorsque le niveau aérobie passe de faible à intermédiaire, mais n'augmente plus lorsque le niveau aérobie passe d'intermédiaire à élevé (respectivement $51 \pm 4,5$ et 68 ± 4 ml·min⁻¹·kg⁻¹) (Figueira et al. 2008). La durée de la composante rapide pouvant être dépendante du niveau de forme physique, la durée de la période de travail doit être adaptée si l'objectif de l'exercice intermittent est de maximiser les fluctuations du $\dot{V}O_2$ sur la période d'exercice. Nous proposons que la durée du cycle soit augmentée chez les personnes déconditionnées par rapport à nos participants sédentaires. Inversement, elle pourrait être réduite chez des athlètes de haut niveau.

L'accumulation de temps à un pourcentage élevé du $\dot{V}O_{2max}$ et la répétition des perturbations métaboliques pendant l'exercice sont les deux mécanismes souvent avancés pour expliquer les bénéfices plus élevés de l'entraînement intermittent (IT). En ligne avec ces hypothèses, la modulation de l'intensité de l'exercice a révélé que l'augmentation de l'intensité de l'exercice pendant l'IT induit des perturbations métaboliques plus élevées, conduisant à de plus grandes améliorations des performances aérobies (Weston et al. 1997; Mohr et al. 2007). Nous avons utilisé une approche alternative, pour augmenter les perturbations métaboliques et acido-basiques en modifiant la durée du cycle de travail. L'influence de la durée du cycle de travail sur les troubles métaboliques a été évaluée par des mesures du $\dot{V}O_2$. Nos résultats, en ligne avec les études antérieures (Turner et al. 2006; Skiba et al. 2014), montrent que la durée cyclique influe sur les fluctuations du $\dot{V}O_2$. Ces résultats suggèrent que le choix de la durée du cycle doit être adaptée dans des contextes pratiques, lorsque l'objectif est de maximiser les fluctuations du $\dot{V}O_2$.

POINTS CLEFS

- La durée du cycle effort:repos influe sur les fluctuations métaboliques.
 - La modalité 60s:60s permet de plus grandes fluctuations du $\dot{V}O_2$ comparé aux modalités 30s:30s et 120s:120s.
-

2. Etude 2

Les objectifs de cette étude étaient de : 1) vérifier que la modalité intermittente n'entraîne pas de modification du pattern moteur comparé à la modalité continue, et 2) comparer les réponses physiologiques entre un exercice continu et un exercice intermittent de même intensité et de même durée de pédalage. Les sujets ont effectués 2 exercices de 30min de pédalage à 70%WR_{pic} : 1) 30min et 2) 30 x 1min d'effort/1min de repos.

2.1. Résultats

Dépense énergétique

Aucune différence n'a été observée entre les deux exercices pour la quantité totale de travail effectué (en kJ : 342 ± 40 et 345 ± 34 , respectivement pour le CON et l'INT) et la consommation d'O₂ totale (O₂ en L : 89 ± 12 et 85 ± 15 , respectivement pour le CON et l'INT). L'exercice CON, comparé à l'exercice INT, a induit un $\dot{V}O_2$ moyen supérieur (en L·min⁻¹ : $2,61 \pm 0,32$ vs. $1,46 \pm 0,24$, respectivement pour le CON et l'INT, $p < 0,05$) et un temps passé à plus de 90% $\dot{V}O_2$ cible plus important (en sec : 1644 ± 152 vs. 356 ± 301 , respectivement pour le CON et l'INT, $p < 0,05$).

Variations métaboliques

La [figure 39](#) représente la consommation d'oxygène cycle-par-cycle du sujet 10 pour l'exercice intermittent et continu.

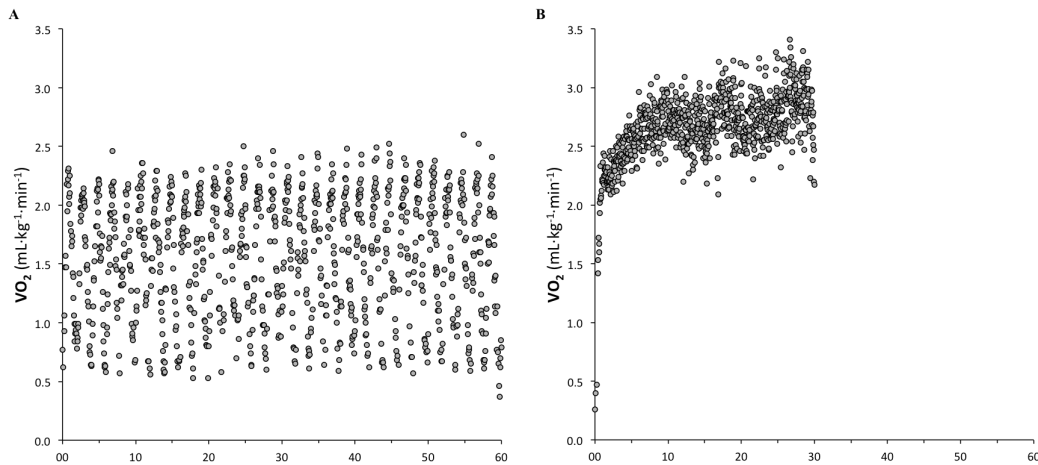


Figure 39. Réponses représentatives de $\dot{V}O_2$

Réponse représentative (sujet 10) de la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$) cycle-par-cycle pour les exercices (A) modalité continue et (B) modalité intermittente.

L'analyse des variations du $\dot{V}O_2$ au cours des efforts met en évidence une amplitude supérieure pour la modalité INT (en $L \cdot min^{-1}$: 201 ± 40 vs. 88 ± 30 , respectivement pour l'INT vs. le CON, $p < 0,05$) ainsi qu'une dérivée moyenne plus importante (en $ml \cdot sec^{-2}$: $2,94 \pm 0,62$ vs. $1,99 \pm 0,67$, respectivement pour l'INT et le CON, $p < 0,05$). De même, l'indice de fluctuation métabolique montre des valeurs 4 fois plus importantes pour la modalité INT (en $ml^2 \cdot sec^{-3}$: 10269 ± 4349 vs. 3237 ± 2113 , respectivement pour l'INT et le CON, $p < 0,05$) ([figure 40](#)).

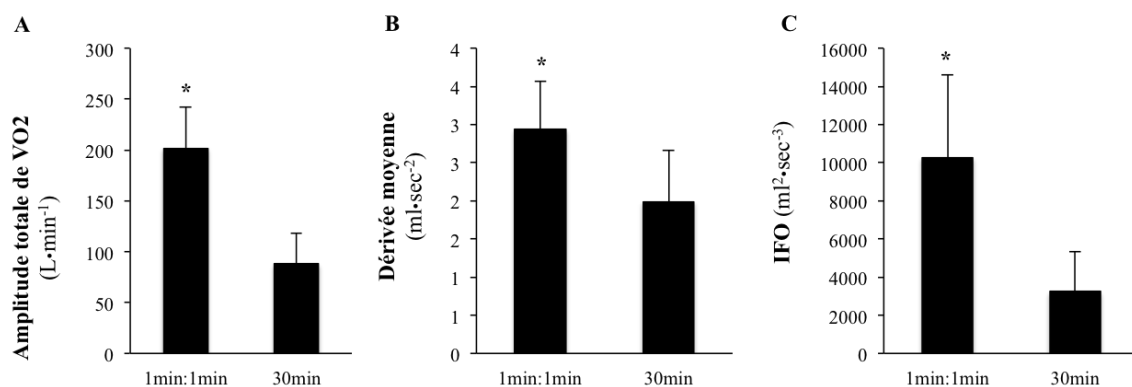


Figure 40. Quantification des fluctuations de $\dot{V}O_2$

Effet de la modalité (INT et CON) sur (A) l'amplitude totale de $\dot{V}O_2$, (B) la dérivée moyenne et (C) l'Index de Fluctuation de l'Oxygène (IFO). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. * $p < 0,01$; $n = 10$ pour chaque groupe.

Oxygénation musculaire

La modalité CON a permis de passer un temps à plus de 90%HHb_{max} supérieur à celui observé lors de la modalité INT (en sec : 644 ± 591 vs. 76 ± 120 , respectivement pour le CON et INT, $p < 0,05$). Au contraire, c'est l'exercice INT qui induit une amplitude plus importante (en U.A. : 2945 ± 1306 vs. 218 ± 99 , respectivement pour l'INT et le CON, $p < 0,05$) et une dérivée moyenne supérieure (en U.A.·sec⁻¹ : 32 ± 14 vs. 5 ± 2 , respectivement pour l'INT et le CON, $p < 0,05$). Le même profil a été observé pour l'indice de fluctuation métabolique avec des valeurs 122 fois plus importantes pour la modalité INT (en U.A.·sec⁻¹ : 109693 ± 100559 vs. 1220 ± 1133 , respectivement pour l'INT et le CON, $p < 0,05$) ([figure 41](#)).

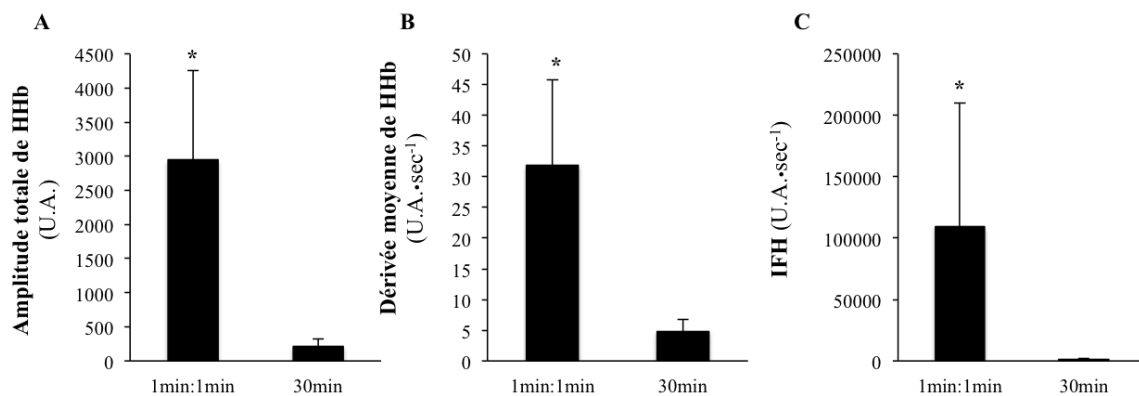


Figure 41. Quantification des fluctuations de HHb

Effet de la modalité (INT et CON) sur (A) l'amplitude d'oscillation totale de HHb, (B) la dérivée moyenne et (C) l'Index de Fluctuation de HHb (IFH). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. * $p < 0,01$; $n = 10$ pour chaque groupe.

Activité musculaire

Pour le VL et le VM, les valeurs de RMS augmentent à partir de la 10^{ème} minute (2) pour le CON (interaction condition par le temps, $p < 0,05$). Pour la MPF, seul le VL montre une diminution sur le CON par rapport à l'INT ($p < 0,05$) ([tableau 7](#)).

Tableau 7. EMG

		VL				VM			
		1	2	3	4	1	2	3	4
RMS	CON	49±17	56±19*	57±17*	58±16*	46±18	51±19*	52±16*	54±15*
	INT	53±19	54±17	53±17	54±17	52±23	52±21	53±20	52±20
MPF	CON	93±17	87±16*§	88±16*§	90±15§	76±8	75±9	75±10	76±10
	INT	93±17	92±16	92±15	94±16	75±8	76±9	77±9	77±8

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. * Différent de la première mesure, § Différent de l'autre modalité, pour le même temps ; $n = 12$ pour chaque groupe.

Concentrations sanguines en lactate et RPE

La $[La]_s$ à la fin de l'exercice CON était plus élevée qu'à 30min et à la fin de l'exercice INT ($p < 0,05$). Pour l'exercice INT, aucune différence n'a été observée entre 30 min et la fin de l'exercice, suggérant ainsi la présence d'un état stable de lactatémie. La perception de l'effort a suivi une évolution similaire avec des valeurs supérieures pour l'exercice CON par rapport à l'exercice INT ($p < 0,05$) et une difficulté maintenue au cours de l'exercice intermittent. De plus, une augmentation graduelle de la RPE est observée au cours de la modalité CON ($p < 0,05$) ([tableau 8](#)).

Tableau 8. Concentration de lactate sanguin et perception de l'effort via l'échelle de Borg (RPE) durant les 2 exercices (70%WR_{pic}).

Condition	CON	INT
Concentration de lactate sanguin (mM)		
Repos	1,36 ± 0,91	1,39 ± 1,00
Fin/30min	4,80 ± 1,50*#	2,36 ± 0,78*
Fin		2,32 ± 1,21*
RPE		
Echauffement	10 ± 2	9 ± 2
10-min/20-min	14 ± 1*#§	13 ± 1*
20-min/40-min	15 ± 1*#§	13 ± 1*
30-min/60-min	16 ± 1*#§	13 ± 1*

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET. * Différent du repos (concentration de lactate sanguin) ou de l'échauffement (RPE) ($p < 0,05$), # Différent de INT ($p < 0,05$), § Différent des autres points ; $n = 12$ pour chaque groupe.

2.2. Discussion

La présente étude a comparé les réponses physiologiques et électromyographiques lors de deux exercices de modalité différente, mais de même intensité et durée de pédalage. Les variations métaboliques ont été plus importantes avec la modalité intermittente, tandis que la contribution du métabolisme anaérobie lactique et le temps passé à un haut $\dot{V}O_2$ ont été plus importants avec la modalité continue. Il semble que le recrutement musculaire évolue de manière différente lors des deux modalités d'exercice.

$\dot{V}O_2$

L'exercice intermittent induit des fluctuations métaboliques plus importantes que l'exercice continu. L'IFO est 4 fois plus grand pour l'exercice intermittent par rapport à l'exercice continu ($p < 0,01$), et s'explique par des variations importantes du $\dot{V}O_2$. En effet, lors de l'exercice intermittent, les sujets répètent des transitions de l'état de repos à l'exercice qui provoquent une variation répétée du $\dot{V}O_2$, associée à une dérivée supérieure par rapport à l'exercice à charge constante ($p < 0,01$). Dans notre étude, l'amplitude moyenne des

fluctuations (point bas-point haut) est de $1,48 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Peu d'études se sont intéressées à la quantification de l'amplitude de la variation du signal du $\dot{V}\text{O}_2$ lors d'exercices intermittents. Dans l'étude de Turner et *al.* (2006), les amplitudes du $\dot{V}\text{O}_2$ obtenues pour la même durée de travail (60s) étaient supérieures, avec $2,38 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Cette différence s'explique par une variation d'intensité supérieure dans l'étude de Turner et *al.* (2006) comparé à notre étude, respectivement 114 et 70% de la puissance maximale aérobie (PMA). En effet, dans leur étude, les sujets alternaient des périodes d'effort à 6 et 120%PMA, tandis que nos sujets ont alterné des périodes d'effort de 0 à 70%PMA. Des amplitudes similaires, de l'ordre de $1,37 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, ont été obtenues dans l'étude de Tuner et *al.* (2006) avec des cycles de 30sec, alternant également 6 et 120%PMA. Ces résultats suggèrent donc que la différence d'intensité entre la récupération et l'exercice n'est pas le seul facteur impliqué dans l'ajustement du $\dot{V}\text{O}_2$, mais que la durée du cycle effort:repos est un critère à prendre en compte pour produire des variations importantes du $\dot{V}\text{O}_2$. C'est ce que nous avons mis en évidence lors de notre première étude.

Oxygénation musculaire

Les réponses musculaires ressemblent à celles obtenues au niveau systémique. Les fluctuations sont plus importantes lors de l'exercice INT : l'amplitude, la dérivée moyenne et l'IFH étaient respectivement ~ 15 , ~ 7 et ~ 122 fois plus élevés par rapport à l'exercice continu. Bhambhani et *al.* (1999), ont comparé quatre exercices d'intensités différentes (40% du seuil lactique (SL), 80%SL, 25%SL-PMA et 50%SL-PMA). Ils ont observé, lors de l'augmentation de l'intensité, que le pourcentage de HbO_2 au niveau musculaire diminuait, suggérant donc que l'intensité est un facteur central dans l'amplitude de la désoxygénation musculaire. Grassi et *al.* (2003), lors d'un exercice à charge constante d'une durée de 5min à une intensité inférieure au second seuil ventilatoire, ont montré que les variations de HbO_2 et HHb se stabilisaient pour atteindre un état stable au bout d'environ 60 secondes. Ainsi, lors d'un exercice à charge variable, une phase d'effort $\leq 60\text{sec}$ permettrait alors d'obtenir des variations de HHb maximales pour ce type d'intensité.

Recrutement musculaire

Pour ce qui concerne les données EMG, les valeurs de RMS sont inférieures pour le CON comparé à l'INT, pour le VL et le VM, au cours de la première minute d'exercice. Ces différences nous semblent difficiles à interpréter. En effet, les électrodes étaient placées au même endroit lors des deux exercices et les valeurs de RMS ont été rapportées à la MVC du jour. Nous nous attendions donc à des valeurs de départ similaires, la première minute d'exercice étant effectuée dans les mêmes conditions pour le CON et l'INT. De plus, les valeurs suivantes (10, 20 et 30^{ème} min) ne diffèrent pas entre les modalités ni entre les deux chefs. Autre point, l'évolution similaire du RMS au cours du CON pour le VL et le VM (respectivement +14 et 13%) ne conduisent pas à la même évolution du MPF. Seul le MPF du VL est diminué à la 10^{ème} min (-5%), pour ce chef, reste diminué à la 20^{ème} min, puis retourne à des valeurs similaires à la 1^{ère} minute d'exercice. L'évolution du MDF (fréquence médiane de puissance) ou MPF est (Cleuziou et al. 2004), ou n'est pas observée (Scheuermann et al. 2001), au cours d'exercices en dessous ou au-dessus du seuil ventilatoire, et plusieurs phénomènes peuvent affecter les valeurs de MPF :

- L'augmentation de la concentration de H^+ , provenant d'une plus grande dépendance de régénération d'ATP par la glycolyse et le système des phosphagènes (Robergs et al. 2004), peut induire un décalage du spectre EMG vers les basses fréquences (Brody et al. 1991). Cependant, ce phénomène est discuté. En effet, des patients atteints de la maladie de Mac Ardle (déficit en phosphorylase musculaire, une enzyme qui aide à briser le glycogène) présentent également un décalage spectral de puissance vers la gauche avec la fatigue, sans aucune modification de la vitesse de conduction des fibres musculaires et du lactate, ou de l'accumulation de H^+ (Mills et Edwards 1984).
- La perte nette de potassium (K^+) dans le muscle (Sjøgaard et al. 1985) affecte le potentiel membranaire et diminue l'excitabilité de la membrane, ce qui induit une altération dans la propagation d'auto-régénération du potentiel d'action et peut induire une diminution du MPF.
- L'élévation de la température intramusculaire, par une modification de la vitesse de conduction des fibres musculaires (Arendt-Nielsen et Zwarts 1989), peut augmenter le signal MPF (Petrofsky et Lind 1980).
- Une augmentation de la décharge des neurones moteurs à contraction lente a été proposée comme augmentant le signal MPF (Borrani et al. 2001), mais ce phénomène n'a pas été décrit dans la littérature.

L'ensemble de ces résultats suggère que le différentiel d'intensité entre la période de récupération et la période d'exercice, l'intensité moyenne et la durée du cycle ont une influence sur les fluctuations métaboliques. Il est nécessaire d'avoir un différentiel important et de courtes périodes de travail ($\leq 60s$) pour obtenir des variations métaboliques importantes. Malgré un temps de pédalage et une intensité identique, les deux exercices montrent deux profils très différents qui sont susceptibles de conduire à des adaptations différentes.

POINTS CLEFS

- Effectuer 30 minutes de pédalage à 70%WR_{pic} suivant une modalité intermittente conduit à des perturbations métaboliques plus importantes.
 - Les variations obtenues sur le $\dot{V}O_2$ vont dans le même sens que celles obtenues avec la mesure de HHb.
 - La modalité continue induit une participation du métabolisme anaérobie et une difficulté supérieure à la modalité intermittente.
-

3. Etude 3

L'objectif de l'étude 3 était de caractériser l'influence de la répétition des perturbations métaboliques sur les voies de l'AMPK, CaMKII et p38-MAPK. Les sujets ont effectués 30min de pédalage à 70%WR_{pic} sous une modalité continue et intermittente : 30min et 30 x 1min/1min de repos.

3.1. Résultats

La dépense énergétique et les réponses de $\dot{V}O_2$

Aucune différence n'a été observée entre la modalité INT et CON pour la consommation d'O₂ (respectivement 87 ± 11 et 86 ± 17 L d'O₂) et la quantité de totale de travail (respectivement 317 ± 41 et 312 ± 56 kJ).

Les réponses représentatives du $\dot{V}O_2$ pendant l'exercice intermittent ont montré des oscillations systématiques synchronisées avec les périodes de travail et de récupération sur toute la durée de l'exercice. Le pic et le point le plus bas des oscillations du $\dot{V}O_2$ ont augmenté légèrement au cours des premiers cycles jusqu'à ce que les valeurs restent inchangées. Cette amplitude est demeurée constante à partir de la seconde répétition. L'analyse de la réponse du $\dot{V}O_2$ a révélé une fluctuation métabolique 2,8 plus élevée pour l'exercice intermittent (respectivement 9620 ± 2285 vs. 3723 ± 1021 mL O₂²·sec⁻³ pour INT et CON).

Les voies de signalisation

La phosphorylation de l'AMPK, CaMKII et p38-MAPK ont été augmentées respectivement ~2,9, 2,7 et 4,2 fois immédiatement après l'exercice (+0h) uniquement après l'exercice intermittent ($p < 0,01$), une augmentation plus importante par rapport à la modalité continue (interaction condition par le temps, $p < 0,05$). Aucune des deux modalités n'a montré une augmentation de la phosphorylation 3h après la fin de l'exercice ([figure 42](#)).

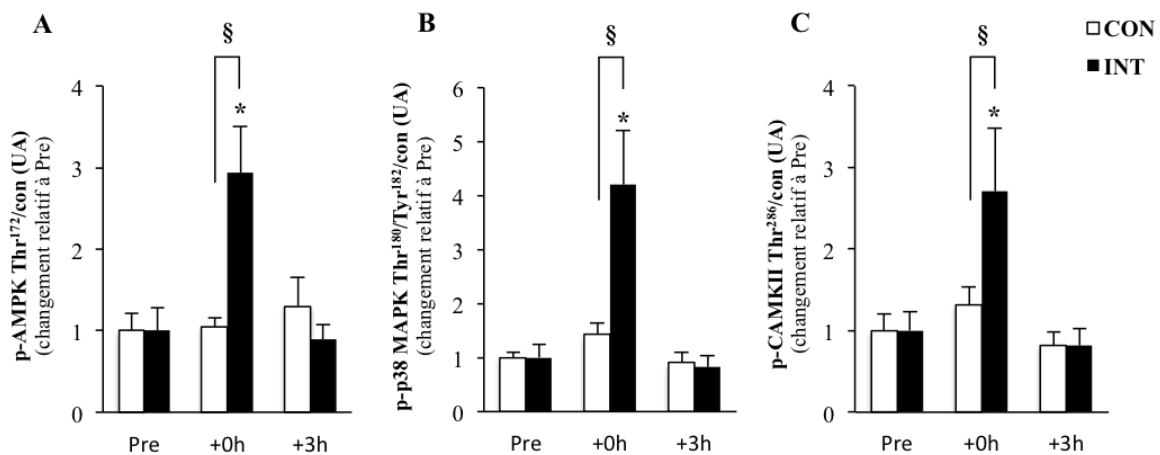


Figure 42. Activation des voies de signalisation

Activation de (A) l'AMPK, (B) p38-MAPK et (C) CaMKII, représentée par la phosphorylation de la protéine rapportée sur le contenu total de cette protéine. Les mesures ont été effectuées avant (Pre), immédiatement après (+0h) et après 3 heures de récupération (+3h) pour l'exercice CON et INT. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET. * Différent du repos $p < 0,01$, § Différence entre les deux modalités $p < 0,05$; $n = 8$ pour chaque groupe.

3.2. Discussion

Nous avons examiné l'activation de trois kinases lors de deux modalités d'exercice différentes (continue vs. intermittente). Pour la même intensité et durée d'exercice, et donc le même travail effectué, l'exercice intermittent induit des fluctuations métaboliques répétées et une phosphorylation supérieure de l'AMPK, CaMKII et p38-MAPK par rapport à l'exercice continu. Ces kinases font partie des voies de signalisation importantes situées en amont de PGC-1 α et elles participent à la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique. Ces résultats suggèrent que les variations métaboliques sont un des mécanismes impliqués dans l'activation de la signalisation de la biogenèse mitochondriale.

Fluctuations métaboliques

C'est lors du passage du repos à l'exercice que les perturbations métaboliques se produisent et que les taux de réaction changent rapidement. En utilisant un modèle de calcul basé sur la physiologie du métabolisme énergétique musculaire, Li et *al.* (2009) ont quantifié l'évolution de paramètres clés du métabolisme énergétique pendant la transition du repos à

l'exercice, à différentes intensités d'exercice. À 60% du $\dot{V}O_{2\max}$, l'état redox cytosolique (NADH/NAD⁺) augmente pour atteindre un pic 2 min après le début de l'exercice, pour ensuite diminuer progressivement. Une diminution concomitante de 50% du rapport ATP:ADP a été observée au début de l'exercice, pour augmenter ensuite progressivement et se stabiliser à 75% des valeurs de repos après 15 min d'exercice. Ce modèle suggère que l'homéostasie cellulaire est plus perturbée dans les premières minutes d'exercice. Par conséquent, la répétition des périodes de travail/repos de 1 minute au cours de l'exercice intermittent induirait une succession d'oscillations métaboliques qui stimulerait la phosphorylation des protéines de manière plus importante qu'un même exercice réalisé de manière continue. Fait intéressant dans notre étude, les fluctuations métaboliques au cours de l'exercice intermittent étaient ~3 fois supérieures à celles de l'exercice continu, dans le même ordre de mesure (de 2,8 à 4,2 fois) que les variations de la phosphorylation des kinases observées post-exercice.

Activation des voies de signalisation

La plupart des études sur la régulation aiguë de kinases liées à la biogenèse mitochondriale ont eu recours à l'utilisation d'exercices très prolongés. Chez la souris, Malek *et al.* (2013) ont comparé un exercice continu de 30 min à 3 épisodes de 10 minutes à la même intensité, séparé par 2 heures. Ils ont trouvé une phosphorylation similaire de p38-MAPK et de l'expression des protéines MEF2A et PGC-1 α dans chaque exercice. Cependant, le petit nombre (3) de répétitions et la grande période de repos entre elles auraient conduit à des fluctuations métaboliques et/ou de surcompensation insuffisantes pour obtenir une différence dans l'activation des kinases étudiées.

Dans notre étude, les deux régimes d'exercice conduisent à des niveaux similaires de phosphorylation 3h après la fin de l'effort, suggérant une régulation spécifique ou des événements de déphosphorylation en baisse au cours de la période de repos. Chez l'homme, Cochran *et al.* (2014) ont comparé quatre épreuves Wingate de 30 sec entrecoupées de 4 min de repos à un exercice isocalorique continu de haute intensité de 4 min. Ils ont trouvé des augmentations similaires de l'activation de l'AMPK et de p38-MAPK lors des deux modalités. La puissance moyenne lors de l'exercice intermittent était environ deux fois celle de l'exercice continu. Des changements supérieurs auraient été observés si l'intensité avait été le seul régulateur de la phosphorylation de l'AMPK et de p38-MAPK. Cependant, le nombre de répétitions, et donc de survenue de fluctuations métaboliques au niveau cellulaire, était

susceptible d'être assez faible. Ceci pourrait expliquer l'absence de différence observée entre les deux conditions. Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que pour une intensité d'exercice donnée, les fluctuations métaboliques causées par la succession des transitions repos-effort lors d'une modalité intermittente sont essentielles pour maximiser l'activation des voies de signalisation de PGC-1 α dans le muscle squelettique.

Surcompensation de l'activité des kinases

AMPK. Différents mécanismes cellulaires peuvent être impliqués dans les réponses observées dans notre étude. L'activité musculaire conduit à une augmentation du rapport AMP:ATP. L'AMP se lie au domaine cystathionine- β -synthase (CBS) de la sous-unité γ de l'AMPK, pour activer l'AMPK (Davies et al. 1995; Suter et al. 2006). Récemment, Xiao et al. (2011) ont montré que l'ADP peut également se lier à l'un des deux sites échangeables de liaison AXP sur le domaine régulateur de l'AMPK, et protège également l'enzyme de la déphosphorylation. Ces études ont montré que l'AMPK activée présente une affinité plus importante pour l'ADP et l'AMP que l'ATP. Cela explique la façon dont l'AMPK peut être régulée, dans des conditions physiologiques basales où la concentration de l'ATP est supérieure à celle de l'ADP et très supérieure à celle de l'AMP. Par conséquent, une augmentation de l'ADP peut être le signal primaire qui favorise la phosphorylation accrue de l'AMPK, surtout en période de stress énergétique modéré. Dans le cadre de notre exercice intermittent, en considérant que la concentration en ADP augmente transitoirement au début de l'exercice (Li et al. 2011), l'accumulation des phases transitoires peut induire des variations plus importantes du rapport AMP:ATP comparées à celles induites par l'exercice continu. Cela supporte l'hypothèse que les fluctuations métaboliques peuvent potentialiser la phosphorylation de l'AMPK pendant l'exercice, indépendamment de l'intensité de l'exercice.

CaMKII. Pendant la contraction musculaire, le Ca²⁺ libéré se lie à protéine régulatrice CaM, ce qui la rend active. CaM se lie ensuite à CaMKII, conduisant à son changement de conformation par dissociation des domaines d'auto-inhibition et catalytique. En outre, l'activation prolongée de CaMKII, par l'interaction de CaMKII avec CaM, résulte de l'autophosphorylation de la thréonine 286 (T286) (Kato et al. 2013). La phosphorylation de T286 stabilise la forme CaMKII liée à CaM, et par conséquent, empêche l'inactivation de CaMKII même après la dissociation de la CaM. Ce mécanisme permet de maintenir son activité (Braun et Schulman 1995; Singla et al. 2001) de sorte que les substrats, tels que PGC-

1 α , peuvent être phosphorylés. Avec les périodes répétées d'augmentation puis de diminution du [Ca²⁺] à l'extérieur du réticulum sarcoplasmique, un plus grand nombre de sous-unités de CaMKII sont susceptibles d'être activées, de telle sorte que le complexe susmentionné présente une plus grande activité Ca²⁺-indépendante (Chin 2005). Ce mécanisme est possiblement impliqué dans la présente étude. L'activité de CaMKII est probablement maintenue lors de l'exercice intermittent, favorisant l'augmentation de la durée de l'activité de la kinase et permettant un plus grand recrutement de kinases. Nos résultats suggèrent donc que malgré une quantité de travail similaire dans les deux exercices, CaMKII semble sensible à la modalité de l'exercice. De plus, des mécanismes d'autophosphorylation similaires ont été également observés pour l'AMPK (Woods et al. 2003) et p38-MAPK (Kim et al. 2005) suggérant que la modalité intermittente peut avoir les mêmes effets sur ces deux autres kinases.

p38-MAPK. Sensible à une contrainte mécanique, p38-MAPK est également impliqué dans la biogenèse mitochondriale car il peut phosphoryler directement PGC-1 α (Puigserver et al. 2001). Malgré une quantité totale de travail similaire accumulée au cours des deux exercices, nous avons observé une plus grande phosphorylation de p38-MAPK suite à l'exercice intermittent. Pendant l'augmentation du calcium cytosolique, Wright et al. (2007a) ont observé une augmentation de la phosphorylation de p38-MAPK suggérant que p38-MAPK est une kinase en aval de la CaMKII. Nous pouvons spéculer que la plus grande activation de la CaMKII, observée après l'exercice intermittent, est impliquée dans la plus grande phosphorylation de p38-MAPK mise en évidence dans notre étude.

En conclusion, la récurrence de fluctuations métaboliques induites par un exercice intermittent semble être un puissant stimulus pour l'activation de kinases modulant PGC-1 α . La modalité intermittente serait métaboliquement plus efficace pour stimuler les voies de signalisation conduisant à la biogenèse mitochondriale.

POINTS CLEFS

- La quantité totale de travail a été similaire pour les deux exercices mais les réponses cellulaires étaient différentes.
 - Les fluctuations métaboliques ont été plus élevées pour l'exercice intermittent.
 - La phosphorylation de l'AMPK, CaMKII et p38-MAPK a été plus importante pour la modalité intermittente.
-

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse nous ont permis de mettre en évidence les points suivants :

- la durée du cycle influence les fluctuations métaboliques induites lors d'un exercice intermittent,
- les fluctuations métaboliques observées au niveau systémique et musculaire sont toutes deux supérieures pour l'exercice intermittent,
- les fluctuations métaboliques amplifient la stimulation des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale, comme en témoigne l'activation plus importante de l'AMPK, de CaMKII et de p38-MAPK.

La notion de fluctuation métabolique

Les fluctuations métaboliques, par le biais de la modalité intermittente, apparaissent comme un élément supplémentaire permettant d'améliorer la capacité oxydative musculaire, comme le flux métabolique avec l'intensité d'exercice (Egan et al. 2010). La combinaison de ces deux éléments semble être la clef de l'efficacité de l'intermittent comparativement aux exercices traditionnels d'endurance (Gibala et al. 2006). Cette combinaison permettrait également d'expliquer les résultats probants des exercices intermittents de très haute intensité qui permettent d'obtenir des résultats similaires aux exercices continus pour des durées d'effort réduites (Gibala et al. 2006). En effet dans ce type d'exercice, l'intensité supra-maximale induit des perturbations cellulaires extrêmement importantes. Dans nos travaux, nous avons choisi d'utiliser une intensité de 70% pour deux raisons. La première est méthodologique, car pour comparer nos deux modalités, il fallait choisir une intensité d'exercice qui soit soutenable par nos sujets pendant 30 minutes. Deuxièmement, notre projet s'inscrit dans le cadre de problématique de santé publique et nous avons choisi une intensité majoritairement utilisée dans la littérature sur les exercices continus dont le but était de développer la capacité aérobie (Wibom et al. 1992; Chesley et al. 1996; Spina et al. 1996). Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'utilisation d'intensités plus élevées lors de l'exercice intermittent permettrait d'obtenir des fluctuations métaboliques importantes. En effet, la haute intensité d'exercice et un différentiel plus important entre les périodes de travail et de récupération sont deux éléments jouant en faveur des fluctuations métaboliques rapides et intenses (Turner et al. 2006). Il est important de prendre en compte que les résultats obtenus

dans nos travaux le sont pour une population spécifique (sujets modérément actif : $\dot{V}O_{2\max}$ compris entre 40 et 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Sachant que les cinétiques du $\dot{V}O_2$ sont influencées par le niveau d'aptitude physique des sujets (Rossiter 2011), il conviendrait d'adapter la durée des cycles au niveau des pratiquants pour maximiser les fluctuations métaboliques. Des intensités plus importantes et/ou des durées de cycles plus courtes pourront être préconisées à mesure de l'amélioration de la condition physique des sujets.

Importance du recrutement musculaire

Une question, soulevée par la comparaison des effets musculaires induits par deux exercices, concerne le recrutement musculaire. En effet, lors d'un exercice, le recrutement des fibres musculaires suit la loi de Henneman (Henneman 1957) qui stipule que le recrutement des motoneurones est fonction à la fois de leur diamètre et de leur excitabilité. Lorsque l'intensité augmente, les fibres rapides sont progressivement recrutées, ce qui pose des questions lors de la comparaison d'exercices d'intensité différente. Effectivement, les réponses à un exercice varient selon le type de fibre. Par exemple, Russel et *al.* (2003) ont mesuré un contenu en protéine PGC-1 α trois fois plus important dans les fibres de type IIa que les fibres de type I après un entraînement de 6 semaines à des intensités proches de celle que nous avons utilisé. Notre méthodologie, à savoir la même intensité pour chaque modalité, peut nous prémunir de ce biais. Cependant, lors de l'exercice intermittent, le sujet doit vaincre l'inertie au début de chaque période d'effort, ce qui peut demander une force musculaire additionnelle. La comparaison de systèmes de faible et haute inertie a mis en évidence que la puissance requise pour lancer la roue, lorsque l'inertie à vaincre est importante, peut être multipliée par deux et donc potentiellement solliciter le recrutement de fibres de type différent (Pearson et al. 2001). Dans notre cas, l'utilisation d'analyse spectrale n'a pas mis en évidence un recrutement spécifique à chacune des modalités ni une modification du type de fibres musculaires recrutées. Cela peut s'expliquer par la faible inertie de la roue de l'ergocycle utilisé. La réelle implication de l'inertie dans la réponse à l'exercice reste à démontrer mais il faudrait privilégier des roues de faible inertie pour ne pas introduire de biais dans les études futures.

Implications pratiques

L'exercice en endurance, effectué régulièrement, induit des adaptations centrales et périphériques. Ces dernières, qui incluent la biogenèse mitochondriale, conduisent les fibres musculaires vers un profil plus oxydatif. L'ensemble de ces adaptations a pour conséquences métaboliques principales une moindre utilisation du glycogène musculaire et du glucose sanguin à la faveur d'une plus grande oxydation des acides gras, ainsi qu'une production de lactate plus faible (Karlsson et al. 1974). Dans l'étude de Karlsson et *al.* (1974), les sujets ont suivi un entraînement de deux mois comprenant 21 sessions de répétitions de sprints de 15s/15s de récupération active. Ils ont effectué un exercice continu avant et après entraînement à la même puissance, d'une durée respective de 90 et 120min. Les valeurs de lactate sanguin et musculaire prélevés à différents temps d'exercice ont été inférieures après entraînement. L'ensemble de ces modifications, induites par l'entraînement, joue un rôle déterminant dans l'augmentation de la capacité d'exercice et de la tolérance à l'effort. Lors de la prise en charge des patients, l'amélioration de la condition physique et la diminution de la pénibilité de l'effort sont les deux éléments finaux qui peuvent être retenus. L'objectif est donc d'identifier l'exercice le plus efficient, ou plutôt les caractéristiques de l'exercice déterminantes pour conduire à ces améliorations. La fonction mitochondriale, qui est un élément clef de la capacité oxydative musculaire, n'est donc pas le seul élément déterminant dans l'amélioration de la condition physique. L'augmentation de la biogenèse mitochondriale peut s'avérer être accompagnée (Daussin et al. 2008) ou non (Malek et al. 2013) par d'autres adaptations, comme par exemple, l'augmentation de la densité capillaire. Il convient donc de ne pas généraliser les résultats obtenus avec un élément de la capacité oxydative à tous les autres, mais de rassembler l'ensemble des informations présentes dans la littérature sur ces différents paramètres. L'isolation d'une caractéristique, comme les fluctuations métaboliques, et d'une composante, comme la biogenèse mitochondriale, permet de mieux comprendre une régulation spécifique lorsqu'elle sera réintégrée dans un ensemble. Un entraînement contenant des exercices dont les caractéristiques sont variées semble être la meilleure solution pour améliorer la capacité oxydative musculaire.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise, pour les adultes, d'effectuer des exercices d'endurance modérés à soutenus par blocs d'au moins 10min afin d'améliorer l'endurance cardio-respiratoire et de réduire les risques de maladies (cardiopathie, accident vasculaires cérébraux, cancer, affection respiratoire chronique, diabète, etc.). Pour un grand

nombre de personnes, la réalisation de blocs de 10min à une intensité soutenue est difficilement réalisable, de même qu'une intensité modérée pour les plus désentraînés. L'utilisation d'une modalité intermittente pour réaliser le temps prescrit semble être une alternative intéressante, et mieux perçue. Notre 2^{ème} étude montre une RPE inférieure au cours de la modalité intermittente par rapport à la modalité continue (respectivement 13 et 15 de moyenne). De plus, la diminution de la durée des blocs, sur l'exercice intermittent, diminue la difficulté de l'exercice comme l'illustre notre 1^{ère} étude avec des valeurs de RPE inférieures pour les cycles 30s:30s et 60s:60s comparé aux cycles 120s:120s (respectivement 12-13 et 14). La RPE peut être utilisée pour cibler une intensité (Garcin et Billat 2001). Des sujets ont effectué deux exercices de 20 minutes à une RPE de 15 (dur) sur rameur et tapis de course. Malgré une difficulté ressentie identique, les sujets ont produit une intensité de travail relative ($\% \dot{V}O_{2pic}$) et obtenu des concentrations en lactate sanguin supérieures pour l'exercice effectué sur tapis roulant (Edwards et Lander 2012). De la même manière, nos résultats suggèrent que l'utilisation de la RPE, pour déterminer l'allure de travail, engendrerait une dépense énergétique supérieure pour la modalité intermittente comparée à la modalité continue. Au départ, la modalité intermittente a été utilisée pour réaliser un temps plus long à une intensité cible et maintenir un haut pourcentage du $\dot{V}O_{2max}$ (Billat 2001), mais l'alternance des charges apparaît aujourd'hui comme un facteur bénéfique pour les adaptations.

Perspectives

La dernière partie de mon travail a permis de mettre en évidence une influence des perturbations métaboliques sur la stimulation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale. Nos résultats suggèrent un effet des perturbations métaboliques sur les voies de signalisation situées en amont de PGC-1 α . Pour avoir une vue complète de l'ensemble des voies de signalisation, nous avons prévus de quantifier les ARNm pour PGC-1 α . Malheureusement cela n'a pas été techniquement possible, ce qui limite la portée de nos résultats, et l'influence de l'activation des voies de signalisation sur PGC-1 α lui-même reste à élucider. L'activation des kinases et les différentes activations conduisent habituellement à des niveaux d'ARNm différents (Egan et al. 2010). La répétition de salves d'ARNm conduit à une augmentation de la protéine correspondante (Perry et al. 2010). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre la quantité d'ARNm et de protéines produites. Il est donc nécessaire de vérifier si ces différences d'activation conduisent à des niveaux

d'ARNm différents mais surtout à une modification au long terme (exercice chronique) de différents marqueurs de la biogenèse mitochondriale. La dissociation des réponses qui s'opèrent entre les différentes étapes, allant de la stimulation des voies de signalisation à la biogenèse mitochondriale, peut s'expliquer par l'existence de processus qui s'opposent afin de maintenir l'homéostasie et de s'adapter aux modifications environnementales. L'activation concurrentielle de différentes protéines, ainsi que l'induction d'ARN interférents, permet d'expliquer les différences existantes entre l'activation d'une protéine, la transcription d'un gène, le contenu en ARN et la production d'une protéine. Il serait donc intéressant de mettre en place une étude visant à identifier l'effet de la modalité d'exercice sur PGC-1 α et la biogenèse mitochondriale au cours de l'exercice aigu et chronique pour une meilleure compréhension de toute la voie de signalisation. Des prélèvements musculaires avant et après entraînement permettraient de suivre l'évolution de la biogenèse mitochondriale au repos. Un prélèvement quelques heures après le premier exercice permettrait d'observer l'induction des ARNm de PGC-1 α et de facteurs de transcriptions comme les NRFs et Tfam.

Conclusion

Mes travaux de thèse se sont déroulés sous la forme de deux protocoles menant à trois études. Ces études se sont imbriquées dans une suite logique dont l'objectif était d'identifier l'influence des fluctuations métaboliques sur les voies de signalisation de la biogenèse mitochondriale. La première étude a permis d'identifier le protocole intermittent comme produisant le plus de fluctuations métaboliques. La seconde a comparé les réponses métaboliques de cette modalité à un exercice continu de même durée et de même intensité. La troisième a identifié l'influence des fluctuations métaboliques sur des voies de signalisations impliquées dans la biogenèse mitochondriale à l'aide des deux exercices précédents. Pour notre population et l'intensité que nous avons choisi (i.e. $70\%WR_{pic}$) : 1) la durée de cycle 60s:60s a permis d'obtenir les fluctuations métaboliques les plus importantes, 2) les fluctuations métaboliques sont supérieures sur la modalité intermittente au niveau systémique et musculaire, et 3) la modalité intermittente induit une activation supérieure des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette influence conduit à des adaptations mitochondriales particulières. Cependant, mes travaux suggèrent d'accorder une attention particulière à cet élément et il est possible de l'intégrer dans les programmes d'entraînement couramment utilisés en réhabilitation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Hafiz HA, Heasley LE, Kyriakis JM, et al (1992) Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol Endocrinol* 6:2079–2089. doi: 10.1210/mend.6.12.1337144
- Adhihetty PJ, Ljubcic V, Menzies KJ, Hood DA (2005) Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C994–C1001. doi: 10.1152/ajpcell.00031.2005
- Ahn B-H, Kim H-S, Song S, et al (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:14447–14452. doi: 10.1073/pnas.0803790105
- Akimoto T, Li P, Yan Z (2008) Functional interaction of regulatory factors with the Pgc-1alpha promoter in response to exercise by in vivo imaging. 295:C288–92. doi: 10.1152/ajpcell.00104.2008
- Akimoto T, Pohnert SC, Li P, et al (2005) Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280:19587–19593. doi: 10.1074/jbc.M408862200
- Alonso G, Ambrosino C, Jones M, Nebreda AR (2000) Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J Biol Chem* 275:40641–40648. doi: 10.1074/jbc.M007835200
- Amat R, Planavila A, Chen SL, et al (2009) SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem* 284:21872–21880. doi: 10.1074/jbc.M109.022749
- Anderson EJ, Neufer PD (2006) Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C844–51. doi: 10.1152/ajpcell.00402.2005
- Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, et al (2008) Dynamic regulation of PGC-1α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell* 7:101–111. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00357.x
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465.
- Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, et al (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 285:21590–21599. doi: 10.1074/jbc.M109.070169
- Arany Z, He H, Lin J, et al (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1:259–271. doi: 10.1016/j.cmet.2005.03.002
- Arendt-Nielsen L, Zwarts M (1989) Measurement of muscle fiber conduction velocity in humans: techniques and applications. *J Clin Neurophysiol* 6:173–190.
- Au HC, Scheffler IE (1998) Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene--both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *Eur J Biochem* 251:164–174.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, et al (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16:1879–1886. doi: 10.1096/fj.02-0367com
- Backs J (2006) CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during

- cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 116:1853–1864. doi: 10.1172/JCI27438
- Banin S, Moyal L, Shieh S, et al (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674–1677.
- Barré L, Richardson C, Hirshman MF, et al (2007) Genetic model for the chronic activation of skeletal muscle AMP-activated protein kinase leads to glycogen accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E802–11. doi: 10.1152/ajpendo.00369.2006
- Bartlett JD, Hwa-Joo C, Jeong TS, et al (2012) Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 mRNA, AMPK, p38 and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 112:1135–1143. doi: 10.1152/jappphysiol.01040.2011
- Bellon S, Fitzgibbon MJ, Fox T, et al (1999) The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* 7:1057–1065.
- Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, et al (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 8:1049–1057.
- Bendayan M, Londono I, Kemp BE, et al (2009) Association of AMP-activated protein kinase subunits with glycogen particles as revealed in situ by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 57:963–971. doi: 10.1369/jhc.2009.954016
- Bhambhani Y, Buckley S, Susaki T (1999) Muscle oxygenation trends during constant work rate cycle exercise in men and women. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 31:90–98.
- Billat LV (2001) Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part I: aerobic interval training. *Sports Med* 31:13–31.
- Birk JB, Wojtaszewski JFP (2006) Predominant $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 577:1021–1032. doi: 10.1113/jphysiol.2006.120972
- Black BL, Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:167–196. doi: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.167
- Borg GA (1982) Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 14:377–381.
- Borrani F, Candau R, Millet GY, et al (2001) Is the VO₂ slow component dependent on progressive recruitment of fast-twitch fibers in trained runners? *J Appl Physiol* 90:2212–2220.
- Bowen TS, Murgatroyd SR, Cannon DT, et al (2011) A raised metabolic rate slows pulmonary O₂ uptake kinetics on transition to moderate-intensity exercise in humans independently of work rate. *Exp Physiol* 96:1049–1061. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058321
- Boyd JC, Simpson CA, Jung ME, Gurd BJ (2013) Reducing the intensity and volume of interval training diminishes cardiovascular adaptation but not mitochondrial biogenesis in overweight/obese men. *PLoS ONE* 8:e68091. doi: 10.1371/journal.pone.0068091
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, et al (2003) Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* 17:1969–1978. doi: 10.1101/gad.1107303
- Braun AP, Schulman H (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57:417–445. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.002221
- Brenmoehl J, Hoeflich A (2013) Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *13:755–761*. doi: 10.1016/j.mito.2013.04.002
- Brittain C, Rossiter H, Kowalchuk J, Whipp B (2001) Effect of prior metabolic rate on the kinetics of oxygen uptake during moderate-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol* 86:125–

134. doi: 10.1007/s004210100514
- Brody LR, Pollock MT, Roy SH, et al (1991) pH-induced effects on median frequency and conduction velocity of the myoelectric signal. *J Appl Physiol* 71:1878–1885.
- Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, et al (1999) Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1129–1134. doi: 10.1042/bse0470069
- Bruce CR, Thrush AB, Mertz VA, et al (2006) Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E99–E107. doi: 10.1152/ajpendo.00587.2005
- Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, et al (2008) Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol (Lond)* 586:151–160. doi: 10.1113/jphysiol.2007.142109
- Burgomaster KA, Hughes SC, Heigenhauser GJF, et al (2005) Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *J Appl Physiol* 98:1985–1990. doi: 10.1152/japplphysiol.01095.2004
- Cam H, Balciunaite E, Blais A, et al (2004) A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* 16:399–411. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.037
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90:859–869.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, et al (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677–1679.
- Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458:1056–1060. doi: 10.1038/nature07813
- Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, et al (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab* 11:213–219. doi: 10.1016/j.cmet.2010.02.006
- Chabi B, Ljubcic V, Menzies KJ, et al (2008) Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 7:2–12. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x
- Chan MHS, McGee SL, Watt MJ, et al (2004) Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: association with IL-6 gene transcription during contraction. *The FASEB Journal* 18:1785–1787. doi: 10.1096/fj.03-1039fje
- Chau CM, Evans MJ, Scarpulla RC (1992) Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem* 267:6999–7006.
- Chen ZP, McConell GK, Michell BJ, et al (2000) AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E1202–6.
- Cheong R, Rhee A, Wang CJ, et al (2011) Information transduction capacity of noisy biochemical signaling networks. *Science* 334:354–358. doi: 10.1126/science.1204553
- Chesley A, Heigenhauser GJ, Spriet LL (1996) Regulation of muscle glycogen phosphorylase activity following short-term endurance training. *Am J Physiol* 270:E328–35.
- Cheung PCF, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J* 22:5793–5805. doi: 10.1093/emboj/cdg552
- Chin ER (2005) Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol* 99:414–423. doi: 10.1152/japplphysiol.00015.2005

- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, et al (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855–859. doi: 10.1038/365855a0
- Clayton DA (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 141:217–232. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62067-7
- Cleuziou C, Perrey S, Borrani F, et al (2004) (.)VO(2) and EMG activity kinetics during moderate and severe constant work rate exercise in trained cyclists. *Can J Appl Physiol* 29:758–772.
- Cochran AJR, Percival ME, Tricarico S, et al (2014) Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp Physiol* 99:782–791. doi: 10.1113/expphysiol.2013.077453
- Coffey VG, Zhong Z, Shield A, et al (2006) Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. *The FASEB Journal* 20:190–192. doi: 10.1096/fj.05-4809fje
- Cohen P (1997) The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 7:353–361. doi: 10.1016/S0962-8924(97)01105-7
- Conley KE, Amara CE, Jubrias SA, Marcinek DJ (2007) Mitochondrial function, fibre types and ageing: new insights from human muscle in vivo. *Exp Physiol* 92:333–339. doi: 10.1113/expphysiol.2006.034330
- Crute BE, Seefeld K, Gamble J, et al (1998) Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:35347–35354.
- Dagon Y, Hur E, Zheng B, et al (2012) p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab* 16:104–112. doi: 10.1016/j.cmet.2012.05.010
- Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA (1995) Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta* 1271:127–134.
- Daussin FN, Rasseneur L, Bouitbir J, et al (2012) Different Timing of Changes in Mitochondrial Functions following Endurance Training. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 44:217–224. doi: 10.1249/MSS.0b013e31822b0bd4
- Daussin FN, Zoll J, Dufour SP, et al (2008) Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R264–72. doi: 10.1152/ajpregu.00875.2007
- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 377:421–425. doi: 10.1016/0014-5793(95)01368-7
- De Rasmio D, Signorile A, Roca E, Papa S (2009) cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *FEBS Journal* 276:4325–4333. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07133.x
- Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, et al (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267:682–685.
- DiMenna FJ, Bailey SJ, Vanhatalo A, et al (2010) Elevated baseline VO₂ per se does not slow O₂ uptake kinetics during work-to-work exercise transitions. *Journal of Applied Physiology* 109:1148–1154. doi: 10.1152/jappphysiol.00550.2010
- Edge J, Eynon N, McKenna MJ, et al (2013) Altering the rest interval during high-intensity interval training does not affect muscle or performance adaptations. *Exp Physiol* 98:481–490. doi: 10.1113/expphysiol.2012.067603
- Edgett BA, Foster WS, Hankinson PB, et al (2013) Dissociation of Increases in PGC-1 α and Its Regulators from Exercise Intensity and Muscle Activation Following Acute Exercise.

- PLoS ONE 8:e71623. doi: 10.1371/journal.pone.0071623.t003
- Edwards AM, Lander PJ (2012) Physiological responses to self-paced exercise: effort-matched comparisons across running and rowing modalities. *J Sports Med Phys Fitness* 52:344–350.
- Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, et al (2010) Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol* 588:1779–1790. doi: 10.1113/jphysiol.2010.188011
- Egan B, O'Connor PL, Zierath JR, O'Gorman DJ (2013) Time course analysis reveals gene-specific transcript and protein kinetics of adaptation to short-term aerobic exercise training in human skeletal muscle. *PLoS ONE* 8:e74098. doi: 10.1371/journal.pone.0074098
- Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, et al (2004) Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 13:935–944. doi: 10.1093/hmg/ddh109
- Elander A, Sjöström M, Lundgren F, et al (1985) Biochemical and morphometric properties of mitochondrial populations in human muscle fibres. *Clin Sci* 69:153–164.
- Elbehti-Green A, Au HC, Mascarello JT, et al (1998) Characterization of the human SDHC gene encoding of the integral membrane proteins of succinate-quinone oxidoreductase in mitochondria. *Gene* 213:133–140.
- Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS (2013) Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833:150–161. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.002
- Elzi DJ, Bjornsen AJ, MacKenzie T, et al (2001) Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C350–60.
- Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273:1741–1748.
- Enslen H, Tokumitsu H, Stork PJ, et al (1996) Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10803–10808.
- Evans MJ, Scarpulla RC (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* 264:14361–14368.
- Evans MJ, Scarpulla RC (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4:1023–1034.
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, et al (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 31:289–294. doi: 10.1038/ng909
- Fan M, Rhee J, St-Pierre J, et al (2004) Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes Dev* 18:278–289. doi: 10.1101/gad.1152204
- Feige JN, Lagouge M, Cantó C, et al (2008) Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 8:347–358. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.017
- Ferreira R, Vitorino R, Alves RMP, et al (2010) Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics* 10:3142–3154. doi: 10.1002/pmic.201000173
- Figueira TR, Caputo F, Machado CEP, Denadai BS (2008) Aerobic Fitness Level Typical of

- Elite Athletes is not Associated With Even Faster VO₂ Kinetics During Cycling Exercise. *J Sports Sci Med* 7:132–138.
- Fisher RP, Clayton DA (1988) Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8:3496–3509.
- Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA (1992) DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* 267:3358–3367.
- Fogarty S, Hardie DG (2009) C-terminal phosphorylation of LKB1 is not required for regulation of AMP-activated protein kinase, BRSK1, BRSK2, or cell cycle arrest. *J Biol Chem* 284:77–84. doi: 10.1074/jbc.M806152200
- Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, et al (2000) Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 273:1150–1155. doi: 10.1006/bbrc.2000.3073
- Fujii N, Seifert MM, Kane EM, et al (2007) Role of AMP-activated protein kinase in exercise capacity, whole body glucose homeostasis, and glucose transport in skeletal muscle. *Diabetes Research and Clinical Practice* 77:S92–S98. doi: 10.1016/j.diabres.2007.01.040
- Gallo KA, Johnson GL (2002) Signalling: Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:663–672. doi: 10.1038/nrm906
- Garcia-Roves PM, Osler ME, Holmström MH, Zierath JR (2008) Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase gamma3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem* 283:35724–35734. doi: 10.1074/jbc.M805078200
- Garcin M, Billat V (2001) Perceived exertion scales attest to both intensity and exercise duration. *Percept Mot Skills* 93:661–671. doi: 10.2466/pms.2001.93.3.661
- Gaspari M, Falkenberg M, Larsson N-G, Gustafsson CM (2004) The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J* 23:4606–4614. doi: 10.1038/sj.emboj.7600465
- Ge B, Gram H, Di Padova F, et al (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295:1291–1294. doi: 10.1126/science.1067289
- Geng T, Li P, Okutsu M, et al (2010) PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C572–9. doi: 10.1152/ajpcell.00481.2009
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, et al (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1α. *EMBO J* 26:1913–1923. doi: 10.1038/sj.emboj.7601633
- Gibala MJ, Little JP, van Essen M, et al (2006) Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol (Lond)* 575:901–911. doi: 10.1113/jphysiol.2006.112094
- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, et al (2009) Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 106:929–934. doi: 10.1152/jappphysiol.90880.2008
- Glancy B, Barstow T, Willis WT (2008) Linear relation between time constant of oxygen uptake kinetics, total creatine, and mitochondrial content in vitro. *Am J Physiol Cell Physiology* 294:C79–C87. doi: 10.1152/ajpcell.00138.2007
- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 25:1354–1366. doi: 10.1128/MCB.25.4.1354-1366.2005

- Godin R, Ascah A, Daussin FN (2010) Intensity-dependent activation of intracellular signalling pathways in skeletal muscle: role of fibre type recruitment during exercise. *J Physiol (Lond)* 588:4073–4074. doi: 10.1113/jphysiol.2010.195925
- Gorostiaga EM, Walter CB, Foster C, Hickson RC (1991) Uniqueness of interval and continuous training at the same maintained exercise intensity. *Eur J Appl Physiol* 63:101–107. doi: 10.1007/BF00235177
- Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN (1989) A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9:5022–5033.
- Grassi B, Pogliaghi S, Rampichini S, et al (2003) Muscle oxygenation and pulmonary gas exchange kinetics during cycling exercise on-transitions in humans. *J Appl Physiol* 95:149–158. doi: 10.1152/japplphysiol.00695.2002
- Greenleaf AL, Kelly JL, Lehman IR (1986) Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3391–3394.
- Grozinger CM, Schreiber SL (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7835–7840. doi: 10.1073/pnas.140199597
- Gurd BJ, Perry CGR, Heigenhauser GJF, et al (2010) High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 35:350–357. doi: 10.1139/H10-030
- Haigis MC, Guarente LP (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20:2913–2921. doi: 10.1101/gad.1467506
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, et al (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126:941–954. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.057
- Hallows WC, Lee S, Denu JM (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10230–10235. doi: 10.1073/pnas.0604392103
- Han J, Jiang Y, Li Z, et al (1997a) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386:296–299. doi: 10.1038/386296a0
- Han J, Lee JD, Jiang Y, et al (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271:2886–2891.
- Han J, Wang X, Jiang Y, et al (1997b) Identification and characterization of a predominant isoform of human MKK3. *FEBS Lett* 403:19–22. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00021-5
- Handschin C, Rhee J, Lin J, et al (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7111–7116. doi: 10.1073/pnas.1232352100
- Handschin C, Spiegelman BM (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27:728–735. doi: 10.1210/er.2006-0037
- Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576–596.
- Hanson PI, Schulman H (1992) Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 267:17216–17224.
- Hardie DG (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr* 93:891S–896S. doi: 10.3945/ajcn.110.001925
- Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:774–785. doi: 10.1038/nrm2249

- Hardie DG (2014) AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *J Intern Med*. doi: 10.1111/joim.12268
- Hardie DG, Carling D (1997) The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246:259–273.
- Hardie DG, Carling D, Gamblin SJ (2011) AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends in Biochemical Sciences* 36:470–477. doi: 10.1016/j.tibs.2011.06.004
- Hardie DG, Sakamoto K (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21:48–60. doi: 10.1152/physiol.00044.2005
- Hashimoto Y, Soderling TR (1987) Calcium . calmodulin-dependent protein kinase II and calcium . phospholipid-dependent protein kinase activities in rat tissues assayed with a synthetic peptide. *Arch Biochem Biophys* 252:418–425.
- Hawley SA, Davison M, Woods A, et al (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271:27879–27887.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, et al (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2:9–19. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.009
- Henneman E (1957) Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 126:1345–1347.
- Hermens HJ, Freriks B, Disselhorst-Klug C, Rau G (2000) Development of recommendations for SEMG sensors and sensor placement procedures. *J Electromyogr Kinesiol* 10:361–374.
- Herzig S, Long F, Jhala US, et al (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413:179–183. doi: 10.1038/35093131
- Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, et al (1999) Characterization of the human SDHD gene encoding the small subunit of cytochrome b (cybS) in mitochondrial succinate-ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1412:295–300.
- Holloszy JO (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 242:2278–2282.
- Holloway GP, Perry CGR, Thrush AB, et al (2008) PGC-1alpha's relationship with skeletal muscle palmitate oxidation is not present with obesity despite maintained PGC-1alpha and PGC-1beta protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E1060–9. doi: 10.1152/ajpendo.00726.2007
- Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW (1999) Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* 87:1990–1995.
- Hong S-P, Momcilovic M, Carlson M (2005) Function of mammalian LKB1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *J Biol Chem* 280:21804–21809. doi: 10.1074/jbc.M501887200
- Hoppeler H (1986) Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7:187–204. doi: 10.1055/s-2008-1025758
- Hoppeler H, Howald H, Conley K, et al (1985) Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 59:320–327.
- Hoppeler H, Lüthi P, Claassen H, et al (1973) The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 344:217–232.
- Hoppins S, Lackner L, Nunnari J (2007) The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:751–780. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048
- Horman S, Vertommen D, Heath R, et al (2006) Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172

- phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem* 281:5335–5340. doi: 10.1074/jbc.M506850200
- Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, et al (2005) Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C185–94. doi: 10.1152/ajpcell.00207.2004
- Howald H, Hoppeler H, Claassen H, et al (1985) Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 403:369–376.
- Howley ET, Bassett DR, Welch HG (1995) Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 27:1292–1301.
- Hudson ER, Pan DA, James J, et al (2003) A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13:861–866.
- Hurley RL (2005) The Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 280:29060–29066. doi: 10.1074/jbc.M503824200
- Hurley RL, Barré LK, Wood SD, et al (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem* 281:36662–36672. doi: 10.1074/jbc.M606676200
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90–94. doi: 10.1126/science.275.5296.90
- Im J-S, Lee J-K (2008) ATR-dependent activation of p38 MAP kinase is responsible for apoptotic cell death in cells depleted of Cdc7. *J Biol Chem* 283:25171–25177. doi: 10.1074/jbc.M802851200
- Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, et al (2003) PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1669–77. doi: 10.1152/ajpcell.00409.2002
- Irrcher I, Ljubicic V, Kirwan AF, Hood DA (2008) AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. *PLoS ONE* 3:e3614. doi: 10.1371/journal.pone.0003614
- Iseli TJ, Walter M, van Denderen BJW, et al (2005) AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186–270). *J Biol Chem* 280:13395–13400. doi: 10.1074/jbc.M412993200
- Jackman MR, Willis WT (1996) Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am J Physiol* 270:C673–8.
- Jacobs I, Esbjörnsson M, Sylvén C, et al (1987) Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fiber types, and blood lactate. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 19:368–374.
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12017–12022. doi: 10.1073/pnas.0705070104
- Jensen TE, Leutert R, Rasmussen ST, et al (2012) EMG-Normalised Kinase Activation during Exercise Is Higher in Human Gastrocnemius Compared to Soleus Muscle. *PLoS ONE* 7:e31054. doi: 10.1371/journal.pone.0031054.t002
- Jheng H-F, Tsai P-J, Guo S-M, et al (2012) Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 32:309–319. doi: 10.1128/MCB.05603-11
- Jin C, Reed JC (2002) Yeast and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:453–459. doi:

- 10.1038/nrm832
- Jorgensen SB, Treebak JT, Viollet B, et al (2007) Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E331–9. doi: 10.1152/ajpendo.00243.2006
- Jorgensen SB, Wojtaszewski JFP, Viollet B, et al (2005) Effects of α -AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J* 19:1146–1148. doi: 10.1096/fj.04-3144fje
- Karlsson J, Nordesjö LO, Saltin B (1974) Muscle glycogen utilization during exercise after physical training. *Acta Physiol Scand* 90:210–217. doi: 10.1111/j.1748-1716.1974.tb05579.x
- Kato K-I, Iwamoto T, Kida S (2013) Interactions between α CaMKII and calmodulin in living cells: conformational changes arising from CaM-dependent and -independent relationships. *Mol Brain* 6:37. doi: 10.1186/1756-6606-6-37
- Kay L, Li Z, Mericskay M, et al (1997) Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1322:41–59.
- Kelly JL, Lehman IR (1986) Yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and properties of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 261:10340–10347.
- Kemp BE, Parker MW, Hu S, et al (1994) Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity. *Trends in Biochemical Sciences* 19:440–444.
- Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12:186–192.
- Kim L, Del Rio L, Butcher BA, et al (2005) p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J Immunol* 174:4178–4184. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4178
- Kim N, Lee JO, Lee HJ, et al (2014) AMPK α 2 translocates into the nucleus and interacts with hnRNP H: Implications in metformin-mediated glucose uptake. *Cellular Signalling* 1–7. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.03.023
- Knutti D, Kressler D, Kralli A (2001) Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9713–9718. doi: 10.1073/pnas.171184698
- Kodiha M, Rassi JG, Brown CM, Stochaj U (2007) Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1427–36. doi: 10.1152/ajpcell.00176.2007
- Kramer HF, Goodyear LJ (2007) Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 103:388–395. doi: 10.1152/japplphysiol.00085.2007
- Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, et al (2000) Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88:794–796.
- Krieger DA, Tate CA, McMillin-Wood J, Booth FW (1980) Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 48:23–28.
- Kumar A, Chaudhry I, Reid MB, Boriek AM (2002) Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 277:46493–46503. doi: 10.1074/jbc.M203654200
- Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, et al (1996) Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* 241:909–915.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, et al (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370:223–226. doi: 10.1038/370223a0

- Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807–869.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127:1109–1122. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.013
- Lamarra N, Whipp BJ, Ward SA, Wasserman K (1987) Effect of interbreath fluctuations on characterizing exercise gas exchange kinetics. *J Appl Physiol* 62:2003–2012.
- Lantier L, Fentz J, Mounier R, et al (2014) AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity. *The FASEB Journal* 28:3211–3224. doi: 10.1096/fj.14-250449
- Larsen S, Nielsen J, Neigaard Nielsen C, et al (2012) Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol*. doi: 10.1113/jphysiol.2012.230185
- Lee S, Jeong S-Y, Lim W-C, et al (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 282:22977–22983. doi: 10.1074/jbc.M700679200
- Lee WJ, Kim M, Park H-S, et al (2006) AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 340:291–295. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.011
- Lee-Young RS, Canny BJ, Myers DE, McConell GK (2009) AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training. *J Appl Physiol* 107:283–289. doi: 10.1152/jappphysiol.91208.2008
- Leick L, Wojtaszewski JFP, Johansen ST, et al (2008) PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle.
- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al (2005) PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3:e101. doi: 10.1371/journal.pbio.0030101
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707–719. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015
- Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, et al (2005) AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res* 97:872–879. doi: 10.1161/01.RES.0000187458.77026.10
- Li L, Pan R, Li R, et al (2011) Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes* 60:157–167. doi: 10.2337/db10-0331
- Li Y, Dash RK, Kim J, et al (2009) Role of NADH/NAD⁺ transport activity and glycogen store on skeletal muscle energy metabolism during exercise: in silico studies. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C25–46. doi: 10.1152/ajpcell.00094.2008
- Lin J, Wu H, Tarr PT, et al (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797–801. doi: 10.1038/nature00904
- Lin J, Wu P-H, Tarr PT, et al (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* 119:121–135. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.013
- Litonin D, Sologub M, Shi Y, et al (2010) Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 285:18129–18133. doi: 10.1074/jbc.C110.128918
- Little JP, Safdar A, Wilkin GP, et al (2010) A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol* 588:1011–1022. doi: 10.1113/jphysiol.2009.181743
- Livingstone C, Patel G, Jones N (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent

- transcriptional activation domain. *EMBO J* 14:1785–1797.
- Lizcano JM, Göransson O, Toth R, et al (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 23:833–843. doi: 10.1038/sj.emboj.7600110
- Long YC, Widegren U, Zierath JR (2004) Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 63:227–232. doi: 10.1079/PNS2004346
- Lu G, Kang YJ, Han J, et al (2006) TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *J Biol Chem* 281:6087–6095. doi: 10.1074/jbc.M507610200
- Lu HT, Yang DD, Wysl M, et al (1999) Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J* 18:1845–1857. doi: 10.1093/emboj/18.7.1845
- Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN (2000) Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:4070–4075. doi: 10.1073/pnas.080064097
- Luft R (1994) The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8731–8738.
- Lundblad JR, Kwok RP, Laurance ME, et al (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 374:85–88. doi: 10.1038/374085a0
- MacDougall JD, Hicks AL, MacDonald JR, et al (1998) Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. *J Appl Physiol* 84:2138–2142.
- Macpherson REK, Hazell TJ, Olver TD, et al (2011) Run sprint interval training improves aerobic performance but not maximal cardiac output. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 43:115–122. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181e5eacd
- Malek MH, Hüttemann M, Lee I, Coburn JW (2013) Similar skeletal muscle angiogenic and mitochondrial signalling following 8 weeks of endurance exercise in mice: discontinuous versus continuous training. *Exp Physiol* 98:807–818. doi: 10.1113/expphysiol.2012.070169
- Matsuyama S, Reed JC (2000) Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ* 7:1155–1165. doi: 10.1038/sj.cdd.4400779
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599–609. doi: 10.1038/35085068
- McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG (2009) The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9:23–34. doi: 10.1016/j.cmet.2008.11.008
- McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol* 22:1116–1125.
- McCulloch V, Shadel GS (2003) Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 23:5816–5824.
- McDonough AA, Veiras LC, Minas JN, Ralph DL (2015) Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. *Am J Physiol Cell Physiol* 308:C426–33. doi: 10.1152/ajpcell.00400.2014
- McGee SL, Hargreaves M (2004) Exercise and myocyte enhancer factor 2 regulation in human skeletal muscle. *Diabetes* 53:1208–1214.
- McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, et al (2003) Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. *Diabetes* 52:926–928.
- McGee SL, van Denderen BJW, Howlett KF, et al (2008) AMP-activated protein kinase

- regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* 57:860–867. doi: 10.2337/db07-0843
- McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000a) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408:106–111. doi: 10.1038/35040593
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2000b) Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14400–14405. doi: 10.1073/pnas.260501497
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2001a) Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11:497–504.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2001b) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21:6312–6321.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002a) Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol* 14:763–772. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00389-7
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002b) MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends in Biochemical Sciences* 27:40–47.
- Meyer RA (1988) A linear model of muscle respiration explains monoexponential phosphocreatine changes. *Am J Physiol* 254:C548–53.
- Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, et al (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3820–3825. doi: 10.1073/pnas.061035098
- Midgley AW, McNaughton LR, Wilkinson M (2006) Is there an optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners?: empirical research findings, current opinions, physiological rationale and practical recommendations. *Sports Med* 36:117–132.
- Miller BF, Hamilton KL (2012) A perspective on the determination of mitochondrial biogenesis. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302:E496–9. doi: 10.1152/ajpendo.00578.2011
- Mills KR, Edwards RH (1984) Muscle fatigue in myophosphorylase deficiency: power spectral analysis of the electromyogram. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 57:330–335.
- Miska EA, Karlsson C, Langley E, et al (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J* 18:5099–5107. doi: 10.1093/emboj/18.18.5099
- Mitchelhill KI (1997) Posttranslational Modifications of the 5'-AMP-activated Protein Kinase beta 1 Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 272:24475–24479. doi: 10.1074/jbc.272.39.24475
- Miura S, Kai Y, Ono M, Ezaki O (2003) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem* 278:31385–31390. doi: 10.1074/jbc.M304312200
- Mogensen M, Sahlin K (2005) Mitochondrial efficiency in rat skeletal muscle: influence of respiration rate, substrate and muscle type. *Acta Physiol Scand* 185:229–236. doi: 10.1111/j.1365-201X.2005.01488.x
- Mogensen M, Sahlin K, Fernström M, et al (2007) Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:1592–1599. doi: 10.2337/db06-0981
- Mohr M, Krstrup P, Nielsen JJ, et al (2007) Effect of two different intense training regimens on skeletal muscle ion transport proteins and fatigue development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1594–602. doi: 10.1152/ajpregu.00251.2006

- Mokranjac D, Neupert W (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* 33:1019–1023. doi: 10.1042/BST20051019
- Momicilovic M, Hong S-P, Carlson M (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 281:25336–25343. doi: 10.1074/jbc.M604399200
- Montoya J, Christianson T, Levens D, et al (1982) Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7195–7199.
- Morgan TE (1971) Effects of Long-Term Exercise on Human Muscle Mitochondria. 1–9.
- Mu J, Brozinick JT, Valladares O, et al (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7:1085–1094.
- Murgia M, Nagaraj N, Deshmukh AS, et al (2015) Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial specialization. *EMBO Rep* 16:387–395. doi: 10.15252/embr.201439757
- Narkar VA, Downes M, Yu RT, et al (2008) AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 134:405–415. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.051
- Nass MM, Nass S (1963) Intramitochondrial Fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 19:593–611.
- Nordsborg NB, Lundby C, Leick L, Pilegaard H (2010) Relative Workload Determines Exercise-Induced Increases in PGC-1 α mRNA. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 42:1477–1484. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181d2d21c
- North BJ, Verdin E (2007) Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS ONE* 2:e784. doi: 10.1371/journal.pone.0000784
- Oakhill JS, Chen Z-P, Scott JW, et al (2010) β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:19237–19241. doi: 10.1073/pnas.1009705107
- Osawa H, Robey RB, Printz RL, Granner DK (1996) Identification and characterization of basal and cyclic AMP response elements in the promoter of the rat hexokinase II gene. *J Biol Chem* 271:17296–17303.
- Parisi MA, Clayton DA (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252:965–969.
- Parra J, Cadefau JA, Rodas G, et al (2000) The distribution of rest periods affects performance and adaptations of energy metabolism induced by high-intensity training in human muscle. *Acta Physiol Scand* 169:157–165. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00730.x
- Pearson SJ, Harridge SD, Grieve DW, et al (2001) A variable inertial system for measuring the contractile properties of human muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 33:2072–2076.
- Perry CGR, Heigenhauser GJF, Bonen A, Spriet LL (2008) High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 33:1112–1123. doi: 10.1139/H08-097
- Perry CGR, Lally J, Holloway GP, et al (2010) Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* 588:4795–4810. doi: 10.1113/jphysiol.2010.199448
- Petrofsky JS, Lind AR (1980) Frequency analysis of the surface electromyogram during sustained isometric contractions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 43:173–182.
- Philippi M, Sillau AH (1994) Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. *J Exp Biol* 189:1–11.

- Picard M, Csukly K, Robillard M-E, et al (2008) Resistance to Ca^{2+} -induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R659–68. doi: 10.1152/ajpregu.90357.2008
- Picard M, Gentil BJ, McManus MJ, et al (2013) Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 115:1562–1571. doi: 10.1152/japplphysiol.00819.2013
- Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, et al (2011) Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS ONE* 6:e18317. doi: 10.1371/journal.pone.0018317
- Pogozelski AR, Geng T, Li P, et al (2009) p38gamma mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice. *PLoS ONE* 4:e7934. doi: 10.1371/journal.pone.0007934
- Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, et al (2003) AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 13:867–871.
- Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, et al (2009) Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *European Heart Journal* 30:266–277. doi: 10.1093/eurheartj/ehn603
- Ponsot E, Zoll J, N'guessan B, et al (2005) Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J Cell Physiol* 203:479–486. doi: 10.1002/jcp.20245
- Puigserver P, Rhee J, Lin J, et al (2001) Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8:971–982.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, et al (1998) A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92:829–839. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81410-5
- Qi J, Gong J, Zhao T, et al (2008) Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J* 27:1537–1548. doi: 10.1038/emboj.2008.92
- Quinn PG, Granner DK (1990) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cyclic AMP regulatory element. *Mol Cell Biol* 10:3357–3364.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, et al (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270:7420–7426.
- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, et al (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16:1247–1255.
- Remy G, Risco AM, Iñesta-Vaquera FA, et al (2010) Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cellular Signalling* 22:660–667. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.11.020
- Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. (2004) Biochemistry of Exercise-Induced Metabolic Acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:502–516. doi: 10.1152/ajpregu.00114.2004.
- Rodas G, Ventura JL, Cadefau JA, et al (2000) A short training programme for the rapid improvement of both aerobic and anaerobic metabolism. *Eur J Appl Physiol* 82:480–486. doi: 10.1007/s004210000223
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, et al (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113–118. doi: 10.1038/nature03354
- Rose AJ, Kiens B, Richter EA (2006) Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase expression

- and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol (Lond)* 574:889–903. doi: 10.1113/jphysiol.2006.111757
- Rossiter HB (2011) Exercise: Kinetic considerations for gas exchange. John Wiley & Sons, Inc.
- Rowe GC, El-Khoury R, Patten IS, et al (2012) PGC-1 α is Dispensable for Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 7:e41817. doi: 10.1371/journal.pone.0041817.g004
- Röckl KSC, Hirshman MF, Brandauer J, et al (2007) Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* 56:2062–2069. doi: 10.2337/db07-0255
- Rösler K, Hoppeler H, Conley KE, et al (1985) Transfer effects in endurance exercise. Adaptations in trained and untrained muscles. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 54:355–362.
- Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, et al (2003) Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 52:2874–2881.
- Rønnestad BR, Hansen J (2013) Optimizing interval training at power output associated with peak oxygen uptake in well-trained cyclists. *J Strength Cond Res* 1. doi: 10.1519/JSC.0b013e3182a73e8a
- Rønnestad BR, Hansen J, Vegge G, et al (2014) Short intervals induce superior training adaptations compared with long intervals in cyclists - An effort-matched approach. *Scand J Med Sci Sports* 25:143–151. doi: 10.1111/sms.12165
- Safdar A, Little JP, Stokl AJ, et al (2011) Exercise Increases Mitochondrial PGC-1 Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 286:10605–10617. doi: 10.1074/jbc.M110.211466
- Sakamoto K, Göransson O, Hardie DG, Alessi DR (2004) Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E310–7. doi: 10.1152/ajpendo.00074.2004
- Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, et al (2005) Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 24:1810–1820. doi: 10.1038/sj.emboj.7600667
- Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, et al (1994) Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem* 133-134:155–192.
- Saks VA, Kuznetsov AV, Khuchua ZA, et al (1995) Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J Mol Cell Cardiol* 27:625–645.
- Sale DG (1987) Influence of exercise and training on motor unit activation. *Exerc Sport Sci Rev* 15:95–151.
- Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, et al (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403:139–148. doi: 10.1042/BJ20061520
- Sands WA, Palmer TM (2008) Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cellular Signalling* 20:460–466. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.10.005
- Sano M, Tokudome S, Shimizu N, et al (2007) Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* 282:25970–25980. doi: 10.1074/jbc.M703634200

- Scarpulla RC (1997) Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* 29:109–119.
- Scheuermann BW, Hoelting BD, Noble ML, Barstow TJ (2001) The slow component of O₂ uptake is not accompanied by changes in muscle EMG during repeated bouts of heavy exercise in humans. *J Physiol (Lond)* 531:245–256. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0245j.x
- Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, et al (2006) Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10224–10229. doi: 10.1073/pnas.0603968103
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, et al (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113:274–284. doi: 10.1172/JCI19874
- Serpiello FR, McKenna MJ, Bishop DJ, et al (2012) Repeated Sprints Alter Signaling Related to Mitochondrial Biogenesis in Humans. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 44:827–834. doi: 10.1249/MSS.0b013e318240067e
- Servais S (2003) Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 35:24–32. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00177-1
- Shadel GS, Clayton DA (1993) Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem* 268:16083–16086.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821–861. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.821
- Singla SI, Hudmon A, Goldberg JM, et al (2001) Molecular characterization of calmodulin trapping by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 276:29353–29360. doi: 10.1074/jbc.M101744200
- Sjøgaard G, Adams RP, Saltin B (1985) Water and ion shifts in skeletal muscle of humans with intense dynamic knee extension. *Am J Physiol* 248:R190–6.
- Skiba PF, Jackman S, Clarke D, et al (2014) Effect of work and recovery durations on W' reconstitution during intermittent exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 46:1433–1440. doi: 10.1249/MSS.0000000000000226
- Sologub M, Litonin D, Anikin M, et al (2009) TFB2 is a transient component of the catalytic site of the human mitochondrial RNA polymerase. *Cell* 139:934–944. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.031
- Soltys C-LM, Kovacic S, Dyck JRB (2006) Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 290:H2472–9. doi: 10.1152/ajpheart.01206.2005
- Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, et al (1996) Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol* 80:2250–2254.
- Sriwijitkamol A, Coletta DK, Wajcberg E, et al (2007) Effect of Acute Exercise on AMPK Signaling in Skeletal Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes: A Time-Course and Dose-Response Study. *Diabetes* 56:836–848. doi: 10.2337/db06-1119
- St John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y, et al (2010) Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 16:488–509. doi: 10.1093/humupd/dmq002
- Starritt EC, Angus D, Hargreaves M (1999) Effect of short-term training on mitochondrial ATP production rate in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 86:450–454.
- Steinmüller L, Thiel G (2003) Regulation of gene transcription by a constitutively active mutant of activating transcription factor 2 (ATF2). *Biol Chem* 384:667–672. doi:

- 10.1515/BC.2003.074
- Stephens TJ, Chen ZP, Canny BJ, et al (2002) Progressive increase in human skeletal muscle AMPK α 2 activity and ACC phosphorylation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E688–94. doi: 10.1152/ajpendo.00101.2001
- Stephens NK, Hawley JA, Dennis SC, Hopkins WG (1999) Effects of different interval-training programs on cycling time-trial performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 31:736–741.
- Sugino T, Maruyama M, Tanno M, et al (2010) Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *FEBS Lett* 584:2821–2826. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.063
- Sun Y, Connors KE, Yang D-Q (2007) AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem* 306:239–245. doi: 10.1007/s11010-007-9575-6
- Suter M, Riek U, Tuerk R, et al (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281:32207–32216. doi: 10.1074/jbc.M606357200
- Suwa M, Nakano H, Kumagai S (2003) Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol* 95:960–968. doi: 10.1152/jappphysiol.00349.2003
- Suzuki A, Okamoto S, Lee S, et al (2007) Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the α 2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 27:4317–4327. doi: 10.1128/MCB.02222-06
- Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, et al (2000) p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J* 19:6517–6526. doi: 10.1093/emboj/19.23.6517
- Takekawa M, Maeda T, Saito H (1998) Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J* 17:4744–4752. doi: 10.1093/emboj/17.16.4744
- Talanian JL, Galloway SDR, Heigenhauser GJF, et al (2007) Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J Appl Physiol* 102:1439–1447. doi: 10.1152/jappphysiol.01098.2006
- Tan Y, Rouse J, Zhang A, et al (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J* 15:4629–4642.
- Tanaka N, Kamanaka M, Enslen H, et al (2002) Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* 3:785–791. doi: 10.1093/embo-reports/kvf153
- Tanny JC, Moazed D (2001) Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:415–420. doi: 10.1073/pnas.031563798
- Tanoue T, Nishida E (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling* 15:455–462. doi: 10.1016/S0898-6568(02)00112-2
- Taylor EB, Lamb JD, Hurst RW, et al (2005) Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1 α protein abundance: effects of time and intensity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E960–8. doi: 10.1152/ajpendo.00237.2005
- Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6:389–402. doi: 10.1038/nrg1606
- Terada S, Goto M, Kato M, et al (2002) Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296:350–354.

- Teyssier C, Ma H, Emter R, et al (2005) Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation. *Genes Dev* 19:1466–1473. doi: 10.1101/gad.1295005
- Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, et al (2008) AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* 104:429–438. doi: 10.1152/japplphysiol.00900.2007
- Tiranti V, Savoia A, Forti F, et al (1997) Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* 6:615–625.
- Tokumitsu H, Soderling TR (1996) Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade. *J Biol Chem* 271:5617–5622.
- Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, Sahlin K (2000) Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *J Physiol* 528:379–388. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00379.x
- Townley R, Shapiro L (2007) Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* 315:1726–1729. doi: 10.1126/science.1137503
- Turner AP, Cathcart AJ, Parker ME, et al (2006) Oxygen Uptake and Muscle Desaturation Kinetics during Intermittent Cycling. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 38:492–503. doi: 10.1249/01.mss.0000188450.82733.f0
- Vafai SB, Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491:374–383. doi: 10.1038/nature11707
- Van Beekvelt MC, Borghuis MS, Van Engelen BG, et al (2001) Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. *Clin Sci* 101:21–28.
- van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23:936–946. doi: 10.1002/bies.1134
- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, et al (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235:79–82. doi: 10.1006/bbrc.1997.6740
- Viollet B, Horman S, Leclerc J, et al (2010) AMPK inhibition in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45:276–295. doi: 10.3109/10409238.2010.488215
- Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, et al (2009) Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14:3380–3400.
- Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC (1993a) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 7:2431–2445.
- Virbasius JV, Scarpulla RC (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1309–1313.
- Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC (1993b) Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev* 7:380–392.
- Walsh B, Tonkonogi M, Sahlin K (2001) Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 442:420–425. doi: 10.1007/s004240100538
- Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, et al (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol* 19:7816–7827.
- Wang L, Sahlin K (2011) The effect of continuous and interval exercise on PGC-1 α and PDK4 mRNA in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *Acta Physiologica*

- 204:525–532. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02354.x
- Wang LI, Psilander N, Tonkonogi M, et al (2009) Similar Expression of Oxidative Genes after Interval and Continuous Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 41:2136–2144. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181abc1ec
- Warden SM, Richardson C, O'Donnell J, et al (2001) Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J* 354:275–283.
- Wells GD, Noseworthy MD, Hamilton J, et al (2008) Skeletal muscle metabolic dysfunction in obesity and metabolic syndrome. *Can J Neurol Sci* 35:31–40.
- Weston AR, Myburgh KH, Lindsay FH, et al (1997) Skeletal muscle buffering capacity and endurance performance after high-intensity interval training by well-trained cyclists. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75:7–13.
- Wibom R, Hultman E, Johansson M, et al (1992) Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73:2004–2010.
- Widegren U, Jiang XJ, Krook A, et al (1998) Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J* 12:1379–1389. doi: 10.1096/fj.1530-6860
- Wiesner RJ (1992) Regulation of mitochondrial gene expression: transcription versus replication. *Trends Genet* 8:264–265.
- Wilson DE, Povey S, Harris H (1976) Adenylate kinases in man: evidence for a third locus. *Ann Hum Genet* 39:305–313.
- Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, et al (2000) Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88:2219–2226.
- Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, et al (2000) Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 528 Pt 1:221–226.
- Wojtaszewski JFP, Birk JB, Frosig C, et al (2005) 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol* 564:563–573. doi: 10.1113/jphysiol.2005.082669
- Wojtaszewski JFP, Mourtzakis M, Hillig T, et al (2002) Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 298:309–316.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, et al (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2:21–33. doi: 10.1016/j.cmet.2005.06.005
- Woods A, Vertommen D, Neumann D, et al (2003) Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278:28434–28442. doi: 10.1074/jbc.M303946200
- Wright DC, Geiger PC, Han DH, et al (2007a) Calcium Induces Increases in Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 and Mitochondrial Biogenesis by a Pathway Leading to p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry* 282:18793–18799. doi: 10.1074/jbc.M611252200
- Wright DC, Han D-H, Garcia-Roves PM, et al (2007b) Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 282:194–199. doi: 10.1074/jbc.M606116200
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al (1999) Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* 98:115–

124. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80611-X
- Wust RCI, McDonald JR, Sun Y, et al (2014) Slowed muscle oxygen uptake kinetics with raised metabolism are not dependent on blood flow or recruitment dynamics. *J Physiol (Lond)* 592:1857–1871. doi: 10.1113/jphysiol.2013.267476
- Wysk M, Yang DD, Lu HT, et al (1999) Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3763–3768.
- Xiao B, Heath R, Saiu P, et al (2007) Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449:496–500. doi: 10.1038/nature06161
- Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al (2011) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472:230–233. doi: 10.1038/nature09932
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, et al (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270:2008–2011.
- Yu T, Robotham JL, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2653–2658. doi: 10.1073/pnas.0511154103
- Zechner C, Lai L, Zechner JF, et al (2010) Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity. *Cell Metab* 12:633–642. doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.008
- Zeviani M, Di Donato S (2004) Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153–2172. doi: 10.1093/brain/awh259
- Zhang J, Shen B, Lin A (2007) Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends in Pharmacological Sciences* 28:286–295. doi: 10.1016/j.tips.2007.04.008
- Zhao M, New L, Kravchenko VV, et al (1999) Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* 19:21–30.
- Zhou H, Zheng M, Chen J, et al (2006) Determinants that control the specific interactions between TAB1 and p38alpha. *Mol Cell Biol* 26:3824–3834. doi: 10.1128/MCB.26.10.3824-3834.2006
- Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, et al (2003) Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 35:49–56. doi: 10.1038/ng1225
- Zong H, Ren JM, Young LH, et al (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15983–15987. doi: 10.1073/pnas.252625599

ORIGINAL RESEARCH

Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle

Adrien Combes¹, Jeanne Dekerle², Nick Webborn², Peter Watt², Valérie Bougault¹ & Frédéric N. Daussin¹

¹ URePSSS: Physical Activity – Muscle – Health Research Team, EA 7369, University of Lille, Lille, France

² Centre for Sport Exercise Science and Medicine (SESAME), University of Brighton, Eastbourne, UK

Keywords

AMPK, CaMKII, exercise modality, mitochondrial biogenesis, p38-MAPK.

Correspondence

Frédéric N. Daussin, Faculté des Sciences du Sport, 9 rue de l'Université, F-59790 Ronchin, France.

Tel: +33 3 20 88 73 69

Fax: +33 3 20 88 73 63

E-mail: frederic.daussin@univ-lille2.fr

Funding Information

No funding information provided.

Received: 18 June 2015; Accepted: 21 June 2015

doi: 10.14814/phy2.12462

Physiol Rep, 3 (9), 2015, e12462, doi: 10.14814/phy2.12462

Abstract

During transition from rest to exercise, metabolic reaction rates increase substantially to sustain intracellular ATP use. These metabolic demands activate several kinases that initiate signal transduction pathways which modulate transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis. The purpose of this study was to determine whether metabolic fluctuations per se affect the signaling cascades known to regulate peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α). On two separate occasions, nine men performed a continuous (30-min) and an intermittent exercise (30 \times 1-min intervals separated by 1-min of recovery) at 70% of $\dot{V}O_{2peak}$. Skeletal muscle biopsies from the *vastus lateralis* were taken at rest and at +0 h and +3 h after each exercise. Metabolic fluctuations that correspond to exercise-induced variation in metabolic rates were determined by analysis of $\dot{V}O_2$ responses. During intermittent exercise metabolic fluctuations were 2.8-fold higher despite identical total work done to continuous exercise (317 \pm 41 vs. 312 \pm 56 kJ after intermittent and continuous exercise, respectively). Increased phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) (\sim 2.9-fold, $P < 0.01$), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (\sim 2.7-fold, $P < 0.01$) and p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) (\sim 4.2-fold, $P < 0.01$) occurred immediately in both exercises and to a greater extent after the intermittent exercise (condition \times time interaction, $P < 0.05$). A single bout of intermittent exercise induces a greater activation of these signaling pathways regulating PGC-1 α when compared to a single bout of continuous exercise of matched work and intensity. Chronic adaptations to exercise on mitochondria biogenesis are yet to be investigated.

Introduction

One of the most pronounced effect of endurance exercise is an increase in skeletal muscle mitochondrial content as well as enzymes involved in energy supply (Saleem et al. 2014). These adaptations lead to an enhancement of the muscle aerobic function directly associated with improvement in endurance performance (Daussin et al. 2008) and reductions in risk factors associated with a variety of chronic diseases (Wisloff et al. 2005). At a muscular level, peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α

(PGC-1 α) is recognized as a critical regulator of oxidative metabolism, acting as a transcriptional coactivator that regulates adaptive mitochondrial responses to the oxidative state of the cells (Kelly and Scarpulla 2004). The activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) and calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII) signaling pathways are well-characterized upstream modulators of PGC-1 α expression in skeletal muscle (Coffey and Hawley 2007; Jager et al. 2007). These cascades activate downstream regulatory factors (Liu et al. 2005;

Thomson et al. 2008), and in the case of AMPK (Jager et al. 2007) and p38-MAPK (Puigserver et al. 2001), also directly phosphorylate PGC-1 α , thereby increasing transcriptional activation of the PGC-1 α promoter through auto-regulatory mechanisms. While exercise upregulates PGC-1 α content (Mathai et al. 2008; Egan et al. 2010), the contribution of exercise characteristics on the upstream signaling cascades has not been fully elucidated. The interplay between intensity, duration, volume and mode of exercise is yet to be understood in such a way that it might inform exercise prescription.

During transitions from rest to exercise in intermittent exercise, metabolic reaction rate may increase substantially as an attempt to maintain the ATP:ADP ratio in the working muscle cells (Kunz 2001). At submaximal intensities, anaerobic glycolysis in the cytosol, and oxidative phosphorylation in the mitochondria provide most of the ATP used during the on-transient phase. These various reactions cause metabolic disturbances within the cell so that the succession of on-transient phases during intermittent exercise induces a repetition of metabolic changes, defined here as metabolic fluctuations, that are thought to promote mitochondrial biogenesis. Such metabolic fluctuations alongside exercise intensity (Egan et al. 2010) could explain why high-intensity, low-volume interval training may induce similar muscular adaptations to those observed after a more traditional low-intensity but high-volume continuous training, even when the interval training sessions were short (Gibala et al. 2006; Burgomaster et al. 2008). Different training programs have been compared to determine the influence of metabolic fluctuations on aerobic function (Mohr et al. 2007; Edge et al. 2013). However, the results are controversial. For instance, greater skeletal muscle adaptations have been observed following high-intensity exercise training regimen that induces greater metabolic fluctuations (Mohr et al. 2007). Increasing the duration of the rest period between identical exercise bouts attenuates the metabolic fluctuations and the metabolic consequences, in terms of H⁺ and other metabolites, were lessened. Despite this, the consequences, maximal oxygen consumption, and training effects were not different with either a short or longer rest period during interval training (Edge et al. 2013). Whether the metabolic fluctuations *per se* could activate in itself the signaling cascades leading to PGC-1 α is unknown.

In order to identify whether metabolic fluctuations *per se* are involved differently to those observed in continuous exercise in the signaling pathways for mitochondrial biogenesis, we compared an intermittent and a continuous exercise performed at same exercise intensity for it not to be a confounding factor. We hypothesized that for greater metabolic fluctuations during the intermittent exercise

there would be greater increases in stimulatory factors regulating mitochondrial biosynthesis, that is, AMPK, CaMKII, and p38-MAPK phosphorylation postexercise.

Methods

Participants and ethical approval

Nine healthy active men participated in this study (Age: 22 \pm 5 years; Mass: 74 \pm 11 kg; Height: 1.79 \pm 0.04 m; $\dot{V}O_{2peak}$: 44 \pm 6 mL \cdot min⁻¹ \cdot kg⁻¹; WR_{peak}: 261 \pm 22 watts). The volunteers were instructed to pursue their habitual training throughout the study, and to refrain from alcohol and caffeine intake for at least 48 h prior to any of the testing sessions. All the subjects provided signed informed consent prior to their participation. Protocol was approved by the University of Brighton Ethics Committee and conducted according to the Declaration of Helsinki.

Preexperimental procedures

Seven days before the first experimental trial, all participants performed an incremental exercise test to exhaustion on an electrically braked cycle (Schoberer Rad Messtechnik with 8 strain gauges, SRM, Germany) to determine $\dot{V}O_{2peak}$ and peak work rate (WR_{peak}). The test began with a 3-min stage at 75 watts followed by increments of 25 watts every 2 min until volitional exhaustion. Each subject carried out a maximal effort, according to the criteria of Howley et al. (1995).

Experimental trials

Subjects were required to complete two work-matched acute exercise trials on separate occasions in a random order separated by 1 week. Both exercises consisted of 30 min of active cycling at 70% of WR_{peak} in a continuous (CON) or intermittent (INT) modality. The intermittent exercise was constituted of 30 periods of 1-min work intercepted with 1-min of recovery. Subjects were asked to maintain a pedaling frequency of 75 revolutions per minute and they were instructed to reproduce the same diet for 24 h prior each trial.

On the day of each trial, subjects arrived at the laboratory in the morning, 60–90 min after ingesting their habitual breakfast. A resting muscle biopsy sample was obtained from the *vastus lateralis*, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis. After a 10-min resting period, subjects completed a standardized 10-min warm-up at 40% WR_{peak} followed by a 5-min resting period. Then, participants performed the designated exercise modality. Muscle biopsy samples

were obtained immediately upon cessation of cycling and 3 h post exercise. Subjects rested quietly in the laboratory until the last biopsy, and were allowed to consume only water ad libitum.

Apparatus and analysis

Power output and pedaling frequency were continuously recorded using an SRM recording device (SRM Power Control V). Estimation of the total work done for each exercise was determined and expressed in kilojoules (kJ). Heart rate (HR) was measured continuously during each exercise (RS 800, Polar, Kempele, Finland). Pulmonary gas exchanges were computed breath-by-breath using an on-line gas analysis system (MediSoft, Bochum, Germany). Outliers values were removed as per Lamarra et al. (1987) and signal was interpolated to 1-sec intervals, and averaged over 5-sec periods. $\dot{V}O_2$ was used to determine the following variables: the accumulated O_2 consumed over the exercise period (L) and the $\dot{V}O_2$ Fluctuations Index (OFI) computed from the two variables characterizing the $\dot{V}O_2$ fluctuation (amplitude and rate of rise, see eq. 1).

$$\dot{V}O_2 \text{Fluctuations Index (OFI in mL}^2 \cdot \text{sec}^{-3}) = A \cdot RR_{\text{mean}} \quad (1)$$

where A is the sum of $\dot{V}O_2$ gains in $L \cdot \text{min}^{-1}$ and RR_{mean} is the mean $\dot{V}O_2$ rate of rise ($+d\dot{V}O_2 \cdot dt^{-1}$) in $\text{mL} \cdot \text{sec}^{-2}$ during exercise.

Muscle biopsies

Each muscle biopsy sample was taken from the muscle *vastus lateralis* under sterile conditions and local anesthesia. An area of skin and the underlying tissues was anaesthetized with 1 mL of 2% lidocaine and a small (0.5 cm) incision made in order to obtain a tissue sample. A fresh incision was made for each of the three biopsies, in the same leg, at least 2 cm from a previous biopsy site.

Western blot

The frozen muscle samples were homogenized and proteins were separated using a 7.5% mini precast gels (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free, Biorad, Hercules, CA) for 40-min at 200V constant voltage (Mini-PROTEAN Tetra cell and PowerPac Basic power supply, Hercules, CA). Each subject modality samples (continuous or intermittent and Pre, +0 h and +3 h after exercise) were loaded together on the same blot. After the electrophoresis, the total protein quantification as reference was determined with the staining of the gel (Aldridge et al. 2008; Welinder and Ekblad 2011), achieved with entire lanes.

Gel proteins were transferred to a 0.2 μm nitrocellulose with a transfer pack (Trans-Blot Turbo, Bio-rad, Hercules, CA) for 10 min at a constant current of 2.5A with an upper limit of 25V. Non-specific binding was blocked in a 5% milk/TBS-t (10 mmol L^{-1} Tris pH 7.5, 100 mmol L^{-1} NaCl, 0.1% Tween 20) for 2 h at room temperature. Membranes were incubated overnight with a primary antibodies: phospho-AMPK α Thr172 (#2531), AMPK α 23A3 (#2603), phospho-CaMKII Thr286 (#3361), CaMKII pan (#3362), phospho-p38 MAP Kinase Thr180/Tyr182 (#9211) and p38-MAPK (#9212) (1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Membranes were washed in TBS-t and incubated with appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (1:3000; Cell Signaling Technology), visualized by enhanced chemiluminescence (ECL; GE Healthcare, Arlington Heights, IL) and quantified by densitometry (GS800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad, Hercules, CA). Total protein quantification and total protein abundance of each phosphorylated protein were used for normalization where appropriate. A representative staining gel and blot for each protein analyzed are presented in Figures 1 and 2, respectively.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SD. Statistical analyses were performed using Sigma Stat for Windows (version 3.0, SPSS Inc., Chicago, IL). After testing for normality and variance homogeneity, a two-way Analysis of variance with repeated measures was used to identify differences in the activation of signaling cascades. When a significant interaction was detected, data was subsequently analyzed using a post hoc Tukey test. To compare the total work done and all variables associated with the $\dot{V}O_2$ measure-

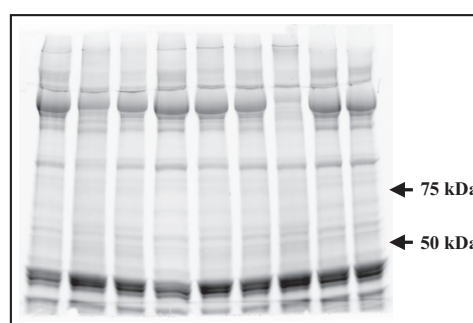


Figure 1. Representative staining gel used as loading control, achieved with entire lanes.

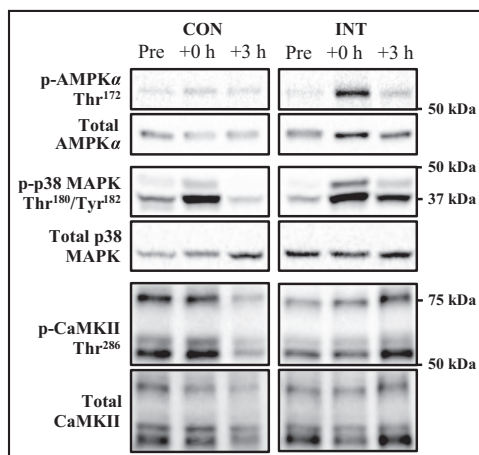


Figure 2. Representative immunoblots corresponding to phosphorylated and total protein expression measured before (Pre), immediately after (+0 h) and after 3 h (+3 h) of recovery from the CON and INT exercise.

ments between the two exercises, a one-way ANOVA was used and followed with a post hoc Tukey test. The significance level was set at a $P < 0.05$.

Results

Energy expenditure and $\dot{V}O_2$ responses

No significant difference was observed between the overall accumulated O_2 consumption throughout the two exercises (in L: 87 ± 11 and 86 ± 17 , for INT and CON, respectively), and the total amount of work accumulated (in kJ: 317 ± 41 , and 312 ± 56 , for INT and CON, respectively). The $\dot{V}O_2$ and HR, mean and peak percentage, were presented in Table 1. The representative $\dot{V}O_2$

responses during intermittent exercise showed systematic oscillations in synchrony with the work to rest duty-cycle over the exercise duration. Both peaks and nadirs of the $\dot{V}O_2$ oscillations increased slightly over the first cycles until the values remained unchanged. This amplitude remained constant from the second repetition. The $\dot{V}O_2$ response analysis reveals a 2.8-fold higher metabolic fluctuation for the intermittent exercise (in $mLO_2 \cdot sec^{-3}$: 9620 ± 2285 and 3723 ± 1021 , for INT and CON, respectively).

Signaling proteins

AMPK, CaMKII, and p38-MAPK phosphorylation were increased ~ 2.9 , 2.7 and ~ 4.2 -fold, respectively, immediately after exercise (+0 h) following the intermittent ($P < 0.01$) but not continuous exercise, neither group showed increased phosphorylation 3 h after exercise finished (Fig. 3). The phosphorylation of the three kinases increased to a greater extent (~ 2.1 , 2.9 and ~ 2.8 -fold, respectively, for APMK, CaMKII, and p38-MAPK) following the intermittent exercise compared to the continuous exercise (condition-by-time interaction, $P < 0.05$).

Discussion

We examined changes in signaling protein phosphorylation in human skeletal muscle after two different exercise modalities (continuous vs. intermittent). For the same intensity and duration of cycling, and therefore work done, the intermittent exercise-induced repeated metabolic fluctuations and higher phosphorylation of AMPK, CaMKII, and p38-MAPK compared with the continuous exercise. These kinases are three important signaling cascades linked to PGC-1 α and the regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. These results suggest that for a same exercise intensity and work done, activation of signaling pathways involved in mitochondrial biogenesis would be greater following intermittent training.

Metabolic fluctuations

It is during both the on- and off-transient of each bout of intermittent exercise that metabolic disturbances occur and reaction rates change rapidly. Using a physiology-based computational model of skeletal muscle energy metabolism, Li *et al.* (2009) quantified the key regulatory factors of skeletal muscle energy metabolism during transition from rest to exercise at various exercise intensities. At 60% of $\dot{V}O_{2max}$, the cytosolic redox state (NADH/NAD $^+$) increases to reach a peak 2-min after the beginning of exercise to then decrease progressively. A con-

Table 1. Mean and percentage peak of $\dot{V}O_2$ and HR.

	CON	INT
$\dot{V}O_2$ (L/min)		
Mean	2.627 ± 0.31	1.443 ± 0.18
% Peak	80 ± 8	45 ± 8
HR (bpm)		
Mean	155 ± 16	120 ± 15
% Peak	87 ± 11	68 ± 11

Mean and percentage peak of $\dot{V}O_2$ and HR for continuous (CON) and intermittent (INT) trails. Values are means \pm SD.

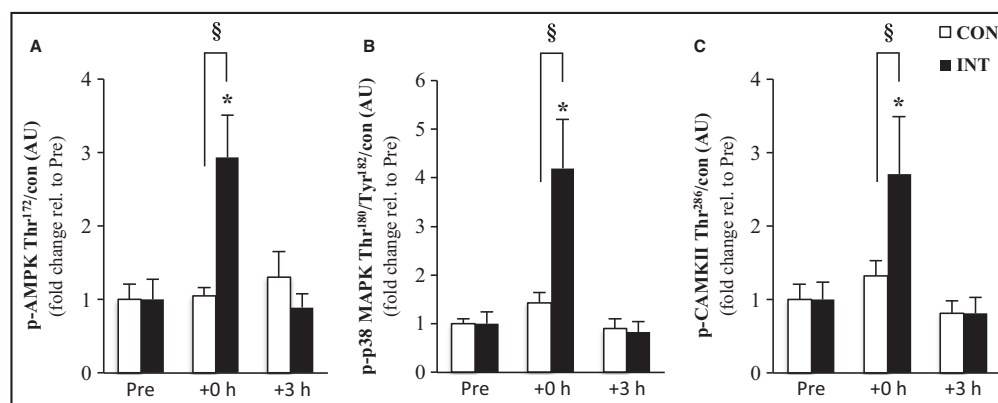


Figure 3. Activation of signaling kinases. The effect of exercise modality on phosphorylation of AMPK (A), p38-MAPK (B) and CaMKII (C) protein immediately after (+0 h) and during recovery (+3 h) from isocaloric exercises. Open bars represent continuous trial, CON; filled bars represent intermittent trial, INT. Phosphorylated protein is normalized to total protein content (con) of the respective protein. Values are means \pm SEM, $n = 9$. *Significantly different from baseline within same trial ($P < 0.01$); §significantly different from CON at the same time point ($P < 0.05$).

comitant 50% decrease in the ATP:ADP ratio was observed at the beginning of exercise, to then increase progressively and stabilize to 75% of resting values after 15 min of exercise. This model suggests that cellular homeostasis is clearly most perturbed in the first few minutes of exercise. Therefore, the repetition of 1-minute work/rest periods during the intermittent exercise would induce a succession of metabolic oscillations that trigger protein phosphorylation. Interestingly in the present study, the metabolic fluctuations during the intermittent exercise were ~ 3 fold those of the continuous exercise, the same extent in scale (from 2.8 to 4.2-fold) to the change in kinases phosphorylation observed post exercise.

Signaling pathways activation

Most of the studies on kinases' acute regulation related to mitochondrial biogenesis have used very prolonged exercise interventions. In mice, Malek et al. (2013) compared a 30-min continuous exercise to 3 bouts of 10-min, separated by 2 h, at the same intensity and found a similar phosphorylation of p38-MAPK, and protein expression of MEF2A and PGC-1 α in each exercise. However, the small number of repetitions and the large rest period between them would have led to insufficient metabolic fluctuations and/or overcompensation for a difference in kinase activation to be observed (Braun and Schulman 1995). In our study, both exercise regimes lead to similar levels of phosphorylation after 3 h, indicating some down regulation or dephosphorylation events during the rest period.

In humans, Cochran et al. (2014) compared four 30-sec Wingate tests interspersed with 4 min of rest to a work-matched continuous high-intensity exercise of 4 min and found similar increases in AMPK and p38-MAPK activation in each exercise. Mean power output during the intermittent exercise was about twice that of the continuous exercise so greater changes might have been expected in their experiment if intensity was the sole regulator of AMPK and p38-MAPK phosphorylation (Edgett et al. 2013). However, the number of repetitions, and therefore occurrence of metabolic fluctuation at the cellular level, despite their severity, was likely to be fairly low. This may explain the lack of difference observed between the two conditions. Bartlett et al. (2012) compared two matched exercises (6×3 -min at 90% $\dot{V}O_{2max}$, vs. 50-min at 70% $\dot{V}O_{2max}$) that elicited similar increases in AMPK and p38 MAPK activation probably due to too similar stimulus and/or a low number of repetitions (i.e. fluctuations). Taken together, our results suggest that for a given exercise intensity, metabolic fluctuations caused by the succession of on- and off-transients during an intermittent exercise are critical to maximize activation of the PGC-1 α signaling pathway in skeletal muscle.

Overcompensation of kinase activity

AMPK mechanisms

Muscular activity leads to an increase in the AMP:ATP ratio. AMP binds to the AMPK cystathionine-b-synthase

(CBS) domain of the γ subunit, to activate AMPK (Davies et al. 1995; Suter et al. 2006). Recently, Xiao et al. (2011) showed that ADP can also bind to one of the two exchangeable AXP-binding sites on the AMPK regulatory domain and also protects the enzyme from dephosphorylation. These studies showed that active AMPK displays significantly tighter binding for ADP and AMP than ATP, explaining how AMPK may be regulated under physiological conditions, where the concentration of ATP is higher than that of ADP and much higher than that of AMP. Therefore, an increase in ADP may be the primary signal that promotes increased phosphorylation of AMPK, especially during moderate energy stress. In the context of our intermittent exercise and considering that ADP concentration increases transiently at the beginning of exercise (Li et al. 2011), a repetition of on-transient phases may induce greater variations in the AMP:ATP ratio when compared to the continuous exercise. This is in support of the assumption that metabolic fluctuations may potentiate the AMPK phosphorylation during exercise, thus independently of exercise intensity.

CaMKII mechanisms

During muscle contraction, Ca^{2+} release binds to and activates the regulatory protein CaM. CaM then binds to the CaM-binding domain of CaMKII leading to its conformational change by dissociation of the auto-inhibitory domain from the catalytic domain. Furthermore, prolonged activation of CaMKII by the interaction of CaMKII with CaM results in the autophosphorylation of threonine-286 (T286) (Kato et al. 2013). Phosphorylation at T286 is thought to stabilize the CaM-bound form of CaMKII and therefore, prevents the inactivation of CaMKII kinase activity even after the dissociation of CaM. This maintains its activity (Braun and Schulman 1995; Singla et al. 2001) so that substrates, like PGC-1 α , can be phosphorylated. With periods of increases and then decreases in $[\text{Ca}^{2+}]$ outside the sarcoplasmic reticulum, a larger number of CaMKII subunits are likely to be activated so that the above-mentioned complex has greater Ca^{2+} -independent CaMKII activity (Chin 2005). These reactions are likely to be greater during the intermittent exercise carried out in the present study. The activity of CaMKII is probably maintained, giving more time for kinase activity but also allowing for a greater recruitment of CaMKII kinases. Despite a similar quantity of work in both exercises, the kinase seems sensitive to the pattern of the exercise. Similar autophosphorylation mechanisms have been also observed for AMPK (Woods et al. 2003) and p38-MAPK (Kim et al. 2005) suggesting that the intermittent pattern of the exercise

per se would enhance these kinases activity similarly to CaMKII.

p38 MAPK mechanisms

The p38-MAPK, sensitive to mechanical stress, is also involved in mitochondrial biogenesis as it can directly phosphorylate PGC-1 α (Puigserver et al. 2001). Despite a similar total amount of work accumulated during the two exercises, we observed a higher p38-MAPK phosphorylation following the intermittent exercise. When raising cytosolic Ca^{2+} , Wright et al. (2007) observed an increase in p38-MAPK phosphorylation suggesting that p38-MAPK is a downstream of CaMKII. We can speculate that this pathway is also activated during exercise for the greater activation of CaMKII observed after the intermittent exercise to explain the greater p38-MAPK phosphorylation.

Perspectives and significance

We are unable to perform PGC1 α mRNA measurements, which would have potentially resolved the question is whether the divergent response observed between the continuous and intermittent exercise protocols translated into differences in PGC-1 α expression. The observed molecular responses were observed in a specific population. As such, studies with similar measurements and PGC1 α mRNA in deconditioned individuals as well as highly trained athletes are much warranted to further improve our understanding in how exercise modality may be used to enhance muscle oxidative adaptations to exercise.

In conclusion, the reoccurrence of metabolic fluctuations induced by an intermittent exercise appears to be a potent stimulus for upstream kinases activations, which are recognized as modulators of PGC-1 α . The intermittent modality would be “metabolically more effective” at stimulating the signaling pathways leading to mitochondrial biogenesis. Futures studies should investigate the effect of exercise modality on PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in acute and chronic exercise for the all-signaling pathways to be better understood.

Acknowledgments

We thank Denis Theunynck, sadly deceased, for his helpful assistance in the organization of muscle biopsies.

References

- Aldridge, G. M., D. M. Podrebarac, W. T. Greenough, and I. J. Weiler. 2008. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J. Neurosci. Methods* 172:250–254.

- Bartlett, J. D.C. Hwa-Joo, T. S. Jeong, J. Louhelainen, A. J. Cochran, M. J. Gibala, et al. (2012). Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 mRNA, AMPK, p38 and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 112:1135–1143.
- Braun, A. P., and H. Schulman. 1995. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.* 57:417–445.
- Burgomaster, K. A., K. R. Howarth, S. M. Phillips, M. Rakobowchuk, M. J. MacDonald, S. L. McGee, et al. 2008. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J. Physiol. (Lond)* 586:151–160.
- Chin, E. R. 2005. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J. Appl. Physiol.* 99:414–423.
- Cochran, A. J. R., M. E. Percival, S. Tricarico, J. P. Little, N. Cermak, J. B. Gillen, et al. 2014. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp. Physiol.* 99:782–791.
- Coffey, V. G., and J. A. Hawley. 2007. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 37:737–763.
- Daussin, F. N., J. Zoll, S. P. Dufour, E. Ponsot, E. Lonsdorfer-Wolf, S. Doutreleau, et al. 2008. Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295:R264–R272.
- Davies, S. P., N. R. Helps, P. T. Cohen, and D. G. Hardie. 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377:421–425.
- Edge, J., N. Eynon, M. J. McKenna, C. A. Goodman, R. C. Harris, and D. J. Bishop. 2013. Altering the rest interval during high-intensity interval training does not affect muscle or performance adaptations. *Exp. Physiol.* 98:481–490.
- Edgett, B. A., W. S. Foster, P. B. Hankinson, C. A. Simpson, J. P. Little, R. B. Graham, et al. 2013. Dissociation of Increases in PGC-1 α and Its Regulators from Exercise Intensity and Muscle Activation Following Acute Exercise. *PLoS ONE* 8: e71623.
- Egan, B., B. P. Carson, P. M. Garcia-Roves, A. V. Chibalin, F. M. Sarsfield, N. Barron, et al. 2010. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 588:1779–1790.
- Gibala, M. J., J. P. Little, M. van Essen, G. P. Wilkin, K. A. Burgomaster, A. Safdar, et al. 2006. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J. Physiol. (Lond)* 575:901–911.
- Howley, E. T., D. R. Bassett, and H. G. Welch. 1995. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27:1292–1301.
- Jager, S., C. Handschin, J. St-Pierre, and B. M. Spiegelman. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104:12017–12022.
- Kato, K.-I., T. Iwamoto, and S. Kida. 2013. Interactions between α CaMKII and calmodulin in living cells: conformational changes arising from CaM-dependent and -independent relationships. *Mol. Brain* 6:37.
- Kelly, D. P., and R. C. Scarpulla. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18:357–368.
- Kim, L., L. Del Rio, B. A. Butcher, T. H. Mogensen, S. R. Paludan, R. A. Flavell, et al. 2005. p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J. Immunol.* 174:4178–4184.
- Kunz, W. S. 2001. Control of oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1504:12–19.
- Lamarra, N., B. J. Whipp, S. A. Ward, and K. Wasserman. 1987. Effect of interbreath fluctuations on characterizing exercise gas exchange kinetics. *J. Appl. Physiol.* 62:2003–2012.
- Li, Y., R. K. Dash, J. Kim, G. M. Saidel, and M. E. Cabrera. 2009. Role of NADH/NAD⁺ transport activity and glycogen store on skeletal muscle energy metabolism during exercise: in silico studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C25–C46.
- Li, L., R. Pan, R. Li, B. Niemann, A.-C. Aurich, Y. Chen, et al. 2011. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes* 60:157–167.
- Liu, Y., W. R. Randall, and M. F. Schneider. 2005. Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 168:887–897.
- Malek, M. H., M. Hüttemann, I. Lee, and J. W. Coburn. 2013. Similar skeletal muscle angiogenic and mitochondrial signalling following 8 weeks of endurance exercise in mice: discontinuous versus continuous training. *Exp. Physiol.* 98:807–818.
- Mathai, A. S., A. Bonen, C. R. Benton, D. L. Robinson, and T. E. Graham. 2008. Rapid exercise-induced changes in PGC-1 α mRNA and protein in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 105:1098–1105.
- Mohr, M., P. Krstrup, J. J. Nielsen, L. Nybo, M. K. Rasmussen, C. Juel, et al. 2007. Effect of two different intense training regimens on skeletal muscle ion transport proteins and fatigue development. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:R1594–R1602.

Characterization of VO₂ fluctuations during intermittent exercise

Adrien COMBES¹, Jeanne DEKERLE², Valérie BOUGAULT¹, Frédéric N. DAUSSIN^{1*}

¹University of Lille, URePSSS – EA7369: Physical Activity – Muscle – Health, Research Team 1, Lille, FRANCE;

²Centre for Sport Exercise Science and Medicine (SESAME), University of Brighton, Eastbourne, UNITED KINGDOM

*Corresponding author

Adress: Faculté des Sciences du Sport, 9 rue de l'Université, F-59790 Ronchin, France

E-mail: frederic.daussin@univ-lille2.fr

Tel: +33 (0)3.20.88.73.69

Fax: +33 (0)3.20.88.73.63

Short title: VO₂ and intermittent exercise

Abstract

Metabolic fluctuations are argued to be one of the most important mechanisms underpinning chronic adaptations following intermittent training. The objective of this study was to quantify oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) fluctuations during intermittent exercise characterized by different duty cycle durations and identify which duration leads to the greatest fluctuations. Ten participants (24 ± 5 years; $\dot{V}O_{2peak}$: 42 ± 7 mL·min⁻¹·kg⁻¹) performed: 1) an incremental test to exhaustion to determine peak work rate (WR_{peak}) and oxygen uptake ($\dot{V}O_{2peak}$), 2), and three 1-hour intermittent exercises alternating work period at 70% WR_{peak} with passive recovery period of different 1:1 work:recovery duty-cycles (30s:30s, 60s:60s, 120s:120s). $\dot{V}O_2$ response analysis revealed differences in the fluctuations across the intermittent modalities despite an identical total volume of oxygen consumed. The sum of the cycle's nadir-to-peak $\dot{V}O_2$ differences ($\Sigma\Delta\dot{V}O_2$) and the $\dot{V}O_2$ fluctuation index (OFI) were both greater in the 60s:60s condition ($\Sigma\Delta\dot{V}O_2$: $+38 \pm 13\%$ and $+19 \pm 18\%$ vs. 120s:120s and 30s:30s, $p < 0.05$; OFI: $+41 \pm 29\%$ and $+67 \pm 62\%$ vs. 120s:120s and 30s:30s, $p < 0.05$). The $\dot{V}O_2$ fluctuated ($+d\dot{V}O_2 \cdot dt^{-1}$) over longer durations during 60s:60s compared to 30s:30s ($+58 \pm 42\%$, $p < 0.05$) and was close to significance for 120s:120s ($+13 \pm 16\%$, $p = 0.08$). A quantification of $\dot{V}O_2$ fluctuation is proposed in the present study and was successful in identifying the intermittent modality associated with the greatest disturbances: the 60s:60s duty-cycle induces more $\dot{V}O_2$ fluctuations. The present findings also demonstrate the selection of the duty-cycle duration for intermittent exercise of a given sub-maximal intensity has an impact on the $\dot{V}O_2$ fluctuations.

Key Words: $\dot{V}O_2$, duty cycle, training prescription, metabolic stress, sub-maximal intensity, modality

Introduction

Regular physical activity and exercise are associated with numerous physical health benefits. Successful endurance training interventions require a thoughtful manipulation of training intensity, duration and frequency, with the implicit goal of enhancing exercise tolerance and associated physiological characteristics (Gorostiaga et al. 1991, Seiler et al. 2013). Maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$), a measure of aerobic capacity and a major predictor of all-cause mortality in normal subjects and cardiovascular disease, can be enhanced following endurance training (Myers et al. 2002).

Two exercise modalities, interval and continuous exercise, are currently used in rehabilitation programs of patients suffering from chronic disorders as well as for the preparation of elite athletes. Studies comparing isocaloric continuous (CT) and interval (IT) training with identical training duration observed greater improvements of endurance performance and $\dot{V}O_{2max}$ with IT (Gorostiaga et al. 1991, Daussin et al. 2008). Three mechanisms can be put forward to explain the greater improvements of $\dot{V}O_{2max}$ following interval training. First, the exercise intensity is an important determinant of the physiological responses to exercise training. A comprehensive review, that there were greater improvements in $\dot{V}O_{2max}$ with vigorous intensity exercise training (60-84% $\dot{V}O_{2max}$) compared with moderate exercise (40-59% $\dot{V}O_{2max}$) (Swain 2005). Second, the interval exercise allows to increase the time spent at a high level of $\dot{V}O_2$, considered very effective when aiming at maximizing a training stimulus (Billat 2001, Seiler et al. 2013). The third possible mechanism responsible for the greater response to IT would relate to the succession of on-transient phases that induce a repetition of metabolic changes, defined in the present paper as metabolic fluctuations.

Because metabolic fluctuations are argued to be one of the most important mechanisms underpinning chronic adaptations following intermittent training (Edge et al. 2013, Cochran et al. 2014, Tucker et al. 2015), the quantification of $\dot{V}O_2$ fluctuations during intermittent exercise, and the subsequent identification of a protocol inducing the greatest fluctuations

would be very informative. We compared three different intermittent exercise realized at 70%WR_{peak} which is an intensity currently recommended and used in rehabilitation programs (Garber et al. 2011).

Materials and Methods

Subjects

Ten healthy active men participated in this study (mean±SD: 24±5 years; 74±11kg; 1.79±0.06m; 13.9±3.1%BF; $\dot{V}O_{2peak}$, 42±7mL·min⁻¹·kg⁻¹). All the subjects provided signed informed consent prior to their participation. The protocol was approved by the University of Brighton Ethics Committee and the study was conducted according to the Declaration of Helsinki.

Experimental Design

Participants performed the following trials: 1) an incremental test, 2) three 1-hour intermittent exercises separated by a minimum of 48-hours.

Assessment of $\dot{V}O_{2peak}$

The test was performed on an electrically-braked cycle (SRM, Germany) and began with a 3-min stage at 75W followed by increments of 25W every 2-min until volitional exhaustion.

Exercise protocols

The intermittent exercises were performed on a customized cycle ergometer (620 Ergomedic; Monark, Varberg, Sweden) fitted with power measuring cranks (Pro Track, 8; SRM). Subjects performed the intermittent tests, after a standardized 10-min warm-up, at 70%WR_{peak} interrupted by passive recovery period, each with a different 1:1 work:recovery duty-cycle (30s:30s, 60s:60s, 120s:120s).

Apparatus and analysis

Pulmonary gas exchange were recorded breath-by-breath using an on-line gas analysis system (MediSoft, Germany). Average oxygen uptake values over 5-sec periods were used to calculate the accumulated O_2 consumed over the exercise period (L) and the mean $\dot{V}O_2$ ($L \cdot min^{-1}$) over the exercise period. The $\dot{V}O_2$ fluctuations were quantified using three distinct variables: 1) A sum of $\dot{V}O_2$ peak-to-nadir amplitudes (L) were computed for each exercise transition and subsequently summed for the entire exercise period ($\Sigma \Delta \dot{V}O_2$, Fig. 1A), 2) For every second of exercise, a rate of change in the $\dot{V}O_2$ response was computed ($+d\dot{V}O_2 \cdot dt^{-1}$) allowing for the duration spent at a rate of rise higher than $20 mL \cdot sec^{-1}$ to be calculated ($T\dot{V}O_{2RR}$, Fig. 1B); the choice of a threshold of $20 mL \cdot sec^{-1}$ was arbitrary but with similar results obtained over a wider range of limits (5 to $60 mL \cdot sec^{-1}$; unpublished data); and 3) A $\dot{V}O_2$ Fluctuations Index (OFI) was finally computed (Equation 1) from the average of the $\dot{V}O_2$ peak-to-nadir amplitude (A, in mL) and the rate of rise (RR_{mean} , in $mL \cdot sec^{-1}$) for the exercise and its cycle duration (T, in seconds see).

$$\text{Equation 1: } \dot{V}O_2 \text{ Fluctuations Index (OFI in } mL^2 \cdot sec^{-2}) = \frac{A \cdot RR_{mean}}{T}$$

Capillary blood lactate concentrations

During the assessment of $\dot{V}O_{2peak}$, capillary blood samples were taken at rest, immediately at the end of exercise and 3-min after the end of exercise. For the intermittent exercises, capillary blood samples were taken at rest, after the warm-up, at 30-min and immediately at the end of exercise. Blood lactate concentration ($[La]_v$) was determined using a Yellow Springs Instrument (YSI 2300 Stat Plus; Analox, Sheffield, UK).

Perception of exertion

The rate of perceived exertion (RPE) was measured using a Borg's category scale 20 (Borg 1982) at the end of each stage during the incremental exercise, and at the end of both warm-up and intermittent exercise.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SD. Statistical analyses were performed using Sigma Stat for Windows (version 3.0, SPSS Inc., Chicago, IL). A two-way ANOVA with repeated measures, and a post-hoc Tukey test, were performed to examine the influence of time and duty-cycle on the four samples of [La]_b. To compare the total work done and all variables associated with the $\dot{V}O_2$ measurements between the three intermittent exercises, a one-way ANOVA was used and followed with a post-hoc Tukey test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

No significant difference was found for the overall accumulated volume of O_2 consumed (O_2 in L: 91 ± 11 , 87 ± 15 and 91 ± 10 , for 30s:30s, 60s:60s and 120s:120s, respectively) and for the mean $\dot{V}O_2$ between the three exercises (in $L\cdot min^{-1}$: 1.51 ± 0.19 , 1.45 ± 0.25 and 1.51 ± 0.17 for 30s:30s, 60s:60s and 120s:120s, respectively). The total amount of work accumulated was also not different between all three conditions (in kJ: 344 ± 33 , 345 ± 34 and 343 ± 35 , for 30s:30s, 60s:60s and 120s:120s, respectively).

The analysis of the $\dot{V}O_2$ oscillations revealed that the duty-cycle duration influences the peak to nadir amplitude ($p<0.05$, table 1). Both peaks and nadirs of the $\dot{V}O_2$ oscillations increased slightly over the first cycles until the values remained unchanged. The mean peak to nadir amplitude increased with the cycle duration (O_2 in L: 0.63 ± 0.10 , 1.48 ± 0.24 and 2.13 ± 0.19 , respectively for 30s:30s, 60s:60s and 120s:120s, $p<0.05$). This amplitude remained constant from the second repetition of the 60s:60s and 30s:30s exercises and from the first repetition of the 120s:120s modality ($p<0.05$, table 2). The peak of the $\dot{V}O_2$ oscillation was also influenced by the duty-cycle duration ($p<0.05$). Mean $\dot{V}O_2$ values reached 60 ± 8 , 72 ± 9 and 84 ± 11 %, respectively during the 30s:30s, 60s:60s and 120s:120s modality ($p<0.05$).

With a higher amplitude and percentage of $\dot{V}O_{2peak}$ recorded in the 120s:120s exercise but a lower number of work to rest transitions performed in the hour of exercise (15 repetitions vs. 30

and 60, respectively for 60s:60s and 30s:30s), $\Sigma\Delta\dot{V}O_2$ was actually found to be greater in the 60s:60s exercise (+38±13 % and +19±18 % when compared to 120s:120s and 30s:30s, respectively; $p<0.05$, Fig. 3A). $T\dot{V}O_{2RR}$ was also greater in the 60s:60s exercise compared to the 30s:30s exercise (+58±42 %, $p<0.05$, Fig. 3B) and the difference was close to significance when compared to the 120s:120s exercise (+13±16 %, $p=0.08$, Fig. 3B). OFI was higher in the 60s:60s (+41±29% and +67±62% when compared to 120s:120s and 30s:30s respectively; $p<0.05$, Fig. 3C).

[La]_b at 30 minutes and at the end of exercise were higher during the 120s:120s compared to the 30s:30s and 60s:60s ($p<0.05$, table 3). For the three exercises, no difference was observed between 30-min and the end of exercise. The rate of perceived exertion was also higher for the 120s:120s compared to the 30s:30s and 60s:60s ($p<0.05$, table 3).

Discussion

The present study aimed to compare the $\dot{V}O_2$ fluctuations of intermittent exercises of same work rate but different duty-cycle duration in order to identify which duty-cycle duration induces the highest $\dot{V}O_2$ fluctuations. We proposed a new methodology to quantify these $\dot{V}O_2$ fluctuations. The 60s:60s modality is shown to produce greater $\dot{V}O_2$ fluctuations, as illustrated by greater sum of the $\dot{V}O_2$ peak-to-nadir amplitude over the exercise, $\dot{V}O_2$ rate of rise during the oscillations and OFI.

$\dot{V}O_2$ oscillations

In the present study, $\dot{V}O_2$ nadir and $\dot{V}O_2$ peak, and consequently the amplitude of the on-transient $\dot{V}O_2$ responses did not change significantly after the first cycles of exercise. Concomitantly, we did not observe any difference in the blood lactate concentration between the 30rd min and the end of the exercise. In a previous study, Turner *et al.* (Turner *et al.* 2006) observed a slow component using 60s:120s and 90s:120s modalities whereas the

responses remained stable during the 10s:20s and 30s:60s modalities. But these authors used an intensity of $120\%WR_{peak}$ which is much greater than the intensity in the present study ($70\%WR_{peak}$), the latter being considered as an heavy intensity which is associated with a $\dot{V}O_2$ slow component with a time delay of 90-180s (Rossiter 2011). Probably because of the low intensity we chose, and the short duty cycles of the three intermittent exercises, the amplitude of the $\dot{V}O_2$ oscillations did not increase over time with no slow component observed as previously described at higher work rates (Hughson and Kowalchuk 1995).

Analysis of the $\dot{V}O_2$ responses revealed that the amount of $\dot{V}O_2$ fluctuations is specific to each modality. The 30s:30s exercise modality was characterized by a smaller amplitude both during the work and recovery periods compared to the other two modalities. A duration of 30-sec is not long enough for the $\dot{V}O_2$ response to reach a steady state during the work period performed at $70\%WR_{peak}$ and during the subsequent recovery period. The 30-sec duration of this rest period does not allow for the $\dot{V}O_2$ to resume to resting values. Furthermore, examination of the 60s:60s exercise modality revealed that this duty-cycle duration produces the highest $\dot{V}O_2$ fluctuations. These results confirm that the amplitude of $\dot{V}O_2$ oscillations during intermittent exercise is directly related to duty cycle duration and work:rest ratio (Turner et al. 2006, Skiba et al. 2014). Increased duty cycle duration as well as work:rest ratio induce an increase of $\dot{V}O_2$ oscillation amplitude.

A work and rest period of 60-sec allows for the $\dot{V}O_2$ on- and off-transient to approach a steady state during both periods. The 120s:120s exercise modality produced the largest $\dot{V}O_2$ amplitude. However, a steady state in the response during the work exercise period could also be seen. This is illustrated by the lower amount of time associated with a rate of rise in the $\dot{V}O_2$ by more than $20\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Because less repetitions are being performed in this modality, the overall (accumulated) amplitude of the $\dot{V}O_2$ fluctuations, our second variable offered for the quantification of $\dot{V}O_2$ fluctuations is lower than during the 60-sec modality.

Control of $\dot{V}O_2$

During exercise, mitochondrial ATP production is stimulated to match a demand. The kinetic control of $\dot{V}O_2$ is proposed to occurs in response to an increase not only in [ADP] and [Pi] but is also associated with a fall in Gibbs free energy of ATP splitting (ΔG_{ATP}) (Glancy et al. 2008). Bowen et al. (Bowen et al. 2011) proposed that reduced cellular energetic state (i.e. reduced [PCr] and increased [ADP] and [Pi]) resulting in a less negative ΔG_{ADP} (Jones et al. 2008) would slow "mitochondrial power" delivery to ATP consuming process (where "mitochondrial power" is the product of ATP production rate and ΔG_{ADP}) linked to $\dot{V}O_2$ by P/O ratio (Glancy et al. 2008). Therefore, a higher $\dot{V}O_2$ at the beginning of the working period would be associated with a less negative ΔG_{ATP} and induced a greater ATP production rate by muscle mitochondria to sustain a constant mitochondrial power delivery. Our findings are in line with previous studies that observed slower $\dot{V}O_2$ kinetics when exercise is initiated from a higher $\dot{V}O_2$ (Brittain et al. 2001, Bowen et al. 2011, Wust et al. 2014). These results support the hypothesis that the rate of $\dot{V}O_2$ rise was directly influenced by the $\dot{V}O_2$ at the beginning of exercise. However, human data from experiment based on the analysis of the $\dot{V}O_2$ kinetics from different metabolic rate shows conflicting results: a reduced intracellular energetic state *per se* may (Bowen et al. 2011) or may not (DiMenna et al. 2010) coincide with a slower $\dot{V}O_2$ kinetics during exercise starting at higher metabolic rates.

Practical considerations

The duration of the fast component may be fitness-dependent, the duration of the work period during intermittent exercise would need to be adapted if the objective of the exercise is to maximize the $\dot{V}O_2$ fluctuations over the exercise period. One may speculate that longer duty-cycle durations should be adopted for patients than the present duration (60-sec) identified as most suitable for our sedentary participants.

The accumulation of time at high percentage of $\dot{V}O_{2max}$ and the repetition of metabolic disturbances during exercise are the two mechanisms often put forward to explain the higher benefits of IT. In line with these approaches, it has been shown that increasing in exercise intensity during IT induced higher metabolic disturbances that led to greater aerobic

performance improvements (Weston et al. 1997, Mohr et al. 2007). An alternative approach to augment the metabolic and acid-base disturbances is to play with the characteristics of intermittent exercise. This study focused on the quantification of $\dot{V}O_2$ fluctuations, surrogate of metabolic disturbances, to assess their changes with manipulation of the duration of the exercise duty cycle. Our results are in line with previous studies (Turner et al. 2006, Skiba et al. 2014) as they demonstrate the influence of the duty-cycle duration on $\dot{V}O_2$ fluctuations. It is clear from the present findings that the duty-cycle duration should be chosen wisely in practical settings when the aim is to maximize these $\dot{V}O_2$ fluctuations. However, the intracellular adaptations induced by these exercises are unknown.

In summary, the present study offers an innovative method for the quantification of $\dot{V}O_2$ fluctuations during intermittent exercise of different duty cycle durations. Comparison of three different durations for the same work rate (70% of WR_{peak}) revealed different levels of $\dot{V}O_2$ fluctuations. In active participants, the 120s:120s modality demonstrates greater changes in the $\dot{V}O_2$ response during both work and recovery periods. However, due to the greater number of repetitions in the 60s:60s modality, the latter induces a greater overall $\dot{V}O_2$ fluctuations despite a similar total work done, when compared to the 30s:30s and 120s:120s modalities.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the participants for their enthusiastic participation; J. Boissière of the Physical Activity – Muscle – Health Research Team for his helpful comments and the construction of the Oxygen Fluctuations Index (OFI).

References

- Billat, L.V. 2001. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part I: aerobic interval training. *Sports Med* **31**(1): 13–31.
- Borg, G.A. 1982. Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **14**(5): 377–381.
- Bowen, T.S., Murgatroyd, S.R., Cannon, D.T., Cuff, T.J., Lainey, A.F., Marjerrison, A.D., Spencer,

- M.D., Benson, A.P., Paterson, D.H., Kowalchuk, J.M., and Rossiter, H.B. 2011. A raised metabolic rate slows pulmonary O₂ uptake kinetics on transition to moderate-intensity exercise in humans independently of work rate. *Exp. Physiol.* **96**(10): 1049–1061. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058321.
- Brittain, C., Rossiter, H., Kowalchuk, J., and Whipp, B.J. 2001. Effect of prior metabolic rate on the kinetics of oxygen uptake during moderate-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol* **86**(2): 125–134. doi: 10.1007/s004210100514.
- Cochran, A.J.R., Percival, M.E., Tricarico, S., Little, J.P., Cermak, N., Gillen, J.B., Tarnopolsky, M.A., and Gibala, M.J. 2014. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp. Physiol.* **99**(5): 782–791. doi: 10.1113/expphysiol.2013.077453.
- Daussin, F.N., Zoll, J., Dufour, S.P., Ponsot, E., Lonsdorfer-Wolf, E., Doutreleau, S., Mettauer, B., Piquard, F., Geny, B., and Richard, R. 2008. Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**(1): R264–72. doi: 10.1152/ajpregu.00875.2007.
- DiMenna, F.J., Bailey, S.J., Vanhatalo, A., Chidnok, W., and Jones, A.M. 2010. Elevated baseline VO₂ per se does not slow O₂ uptake kinetics during work-to-work exercise transitions. *Journal of Applied Physiology* **109**(4): 1148–1154. doi: 10.1152/jappphysiol.00550.2010.
- Edge, J., Eynon, N., McKenna, M.J., Goodman, C.A., Harris, R.C., and Bishop, D.J. 2013. Altering the rest interval during high-intensity interval training does not affect muscle or performance adaptations. *Exp. Physiol.* **98**(2): 481–490. doi: 10.1113/expphysiol.2012.067603.
- Garber, C.E., Blissmer, B., Deschenes, M.R., Franklin, B.A., Lamonte, M.J., Lee, I.-M., Nieman, D.C., Swain, D.P., American College of Sports Medicine. 2011, July. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. doi: 10.1249/MSS.0b013e318213fefb.
- Glancy, B., Barstow, T., and Willis, W.T. 2008. Linear relation between time constant of oxygen uptake kinetics, total creatine, and mitochondrial content in vitro. *Am J Physiol Cell Physiology* **294**(1): C79–C87. doi: 10.1152/ajpcell.00138.2007.
- Gorostiaga, E.M., Walter, C.B., Foster, C., and Hickson, R.C. 1991. Uniqueness of interval and continuous training at the same maintained exercise intensity. *Eur J Appl Physiol* **63**(2): 101–107. doi: 10.1007/BF00235177.
- Hughson, R.L., and Kowalchuk, J.M. 1995. Kinetics of oxygen uptake for submaximal exercise in hyperoxia, normoxia, and hypoxia. *Can J Appl Physiol* **20**(2): 198–210.
- Jones, A.M., Fulford, J., and Wilkerson, D.P. 2008. Influence of prior exercise on muscle [phosphorylcreatine] and deoxygenation kinetics during high-intensity exercise in men. *Exp. Physiol.* **93**(4): 468–478. doi: 10.1113/expphysiol.2007.041897.
- Mohr, M., Krstrup, P., Nielsen, J.J., Nybo, L., Rasmussen, M.K., Juel, C., and Bangsbo, J. 2007. Effect of two different intense training regimens on skeletal muscle ion transport proteins and fatigue development. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**(4): R1594–602. doi: 10.1152/ajpregu.00251.2006.
- Myers, J., Prakash, M., Froelicher, V., Do, D., Partington, S., and Atwood, J.E. 2002. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N. Engl. J. Med.* **346**(11): 793–801. doi: 10.1056/NEJMod011858.
- Rossiter, H.B. 2011. Exercise: Kinetic considerations for gas exchange. John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/cphy.c090010.
- Seiler, S., Jøranson, K., Olesen, B.V., and Hetlelid, K.J. 2013. Adaptations to aerobic interval training: interactive effects of exercise intensity and total work duration. *Scand J Med Sci Sports* **23**(1): 74–83. doi: 10.1111/j.1600-0838.2011.01351.x.
- Skiba, P.F., Jackman, S., Clarke, D., Vanhatalo, A., and Jones, A.M. 2014. Effect of work and recovery durations on W' reconstitution during intermittent exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **46**(7): 1433–1440. doi: 10.1249/MSS.0000000000000226.
- Swain, D.P. 2005. Moderate or vigorous intensity exercise: which is better for improving

- aerobic fitness? *Prev Cardiol* **8**(1): 55–58.
- Tucker, W.J., Sawyer, B.J., Jarrett, C.L., Bhammar, D.M., and Gaesser, G.A. 2015. Physiological Responses to High-Intensity Interval Exercise Differing in Interval Duration. *J Strength Cond Res.* doi: 10.1519/JSC.0000000000001000.
- Turner, A.P., Cathcart, A.J., Parker, M.E., Butterworth, C., Wilson, J., and Ward, S.A. 2006. Oxygen Uptake and Muscle Desaturation Kinetics during Intermittent Cycling. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **38**(3): 492–503. doi: 10.1249/01.mss.0000188450.82733.f0.
- Weston, A.R., Myburgh, K.H., Lindsay, F.H., Dennis, S.C., Noakes, T.D., and Hawley, J.A. 1997. Skeletal muscle buffering capacity and endurance performance after high-intensity interval training by well-trained cyclists. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **75**(1): 7–13.
- Wust, R.C.I., McDonald, J.R., Sun, Y., Ferguson, B.S., Rogatzki, M.J., Spires, J., Kowalchuk, J.M., Gladden, L.B., and Rossiter, H.B. 2014. Slowed muscle oxygen uptake kinetics with raised metabolism are not dependent on blood flow or recruitment dynamics. *J. Physiol. (Lond.)* **592**(8): 1857–1871. doi: 10.1113/jphysiol.2013.267476.

Table 1: Mean responses to three different intermittent exercises (70% of maximal work rate; 3 durations of duty cycle 1:1 work to rest ratio).

		30s:30s	60s:60s	120s:120s
$\dot{V}O_{2peak}$	Absolute ($L \cdot min^{-1}$)	1.825±0.227	2.204±0.348*	2.589±0.242*#
	Relative (% $\dot{V}O_{2max}$)	60±8	72±9*	86±11*#
$\dot{V}O_{2nadir}$	Absolute ($L \cdot min^{-1}$)	1.211±0.182	0.727±0.157*	0.453±0.093*#
	Relative (% $\dot{V}O_{2peak}$)	40±5	24±5*	15±3*#
$\dot{V}O_{2oscillation}$	amplitude ($L \cdot min^{-1}$)	0.629±0.100	1.477±0.242*	2.133±0.186*#
Mean $\dot{V}O_2$	($L \cdot min^{-1}$)	1.511±0.190	1.449±0.251	1.511±0.173

Values are expressed as mean±SD. *Significantly different from 30s:30s ($p<0.05$), #significantly different from 60s:60s ($p<0.05$); n=10 for each group.

Table 2: Mean $\dot{V}O_2$ time course of oscillation

		Work/recovery duty cycle number							
		1	2	3	4	5	15	30	60
30s:30s	Peaks	1.55±0.25	1.86±0.27	1.66±0.32	1.76±0.34	1.74±0.24	1.70±0.20	1.76±0.18	1.87±0.29
	Nadirs	0.24±0.07	1.15±0.17	1.01±0.20	1.14±0.17	1.22±0.24	1.18±0.09	1.19±0.21	1.12±0.15
	Amplitude	1.31±0.23*	0.54±0.18	0.56±0.15	0.61±0.23	0.52±0.18	0.52±0.18	0.57±0.24	0.61±0.11
60s:60s	Peaks	2.06±0.37	2.05±0.30	2.20±0.27	2.12±0.29	2.17±0.34	2.26±0.30	2.27±0.44	
	Nadirs	0.22±0.09	0.81±0.19	0.73±0.19	0.69±0.13	0.70±0.21	0.80±0.14	0.73±0.19	
	Amplitude	1.84±0.32*	1.24±0.25	1.46±0.18	1.43±0.29	1.47±0.28	1.46±0.26	1.53±0.30	
120s:120s	Peaks	2.49±0.24	2.52±0.24	2.64±0.32	2.56±0.32	2.60±0.30	2.67±0.27		
	Nadirs	0.24±0.07	0.44±0.09	0.43±0.12	0.44±0.13	0.47±0.15	0.44±0.10		
	Amplitude	2.26±0.20	2.08±0.18	2.20±0.29	2.13±0.28	2.13±0.24	2.23±0.21		

$\dot{V}O_2$ is expressed in L·min⁻¹. Data are expressed as mean±SD. *Significantly different from the other cycle (p<0.05)

Table 3: Blood lactate concentration and Borg Rating Scale of Perceived Exertion (RPE) during three intermittent exercises (70% WR_{peak}; 3 durations of duty cycle 1:1 work to rest ratio).

Condition	30s:30s	60s:60s	120s:120s
Blood Lactate concentration (mM)			
Rest	1.73±0.47	1.14±0.33	1.34±0.49
30-min	1.80±0.76	2.28±0.98	3.54±1.79*#
End	1.73±0.63	1.97±0.82	3.72±1.65*#
RPE			
Warm-up	9±2	9±2	9±2
End	12±2*	13±1*	14±1*#

Values are expressed as mean±SD. *Significantly different from rest (blood lactate concentration) or warm-up (RPE) ($p<0.05$), #significantly different from 30s:30s and 60s:60s ($p<0.05$); n=10 for each group.

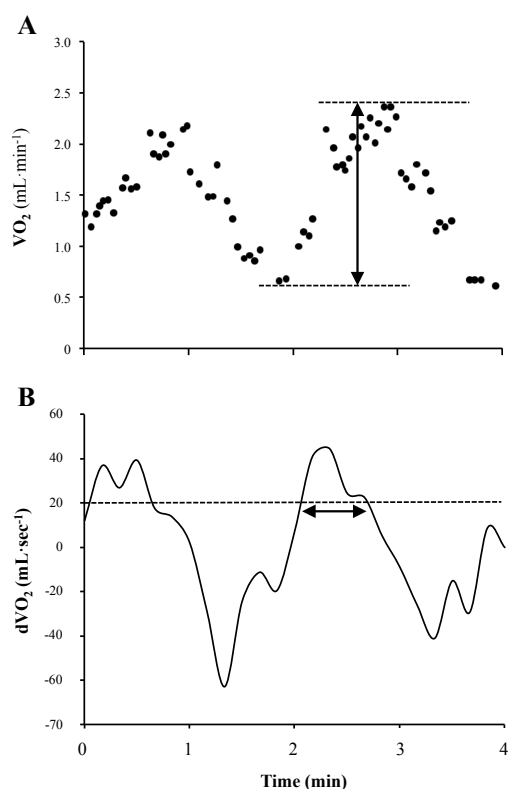


Fig 1. $\dot{V}O_2$ fluctuations analysis. Representative calculation of (A) sum of the $\dot{V}O_2$ peak-to-nadir amplitude (L) for the calculation of $\Sigma\Delta\dot{V}O_2$ and (B) $\dot{V}O_2$ rate of rise ($+d\dot{V}O_2 \cdot dt^{-1}$) higher than 20 mL·sec⁻¹ for the calculation of $T\dot{V}O_{2RR}$.

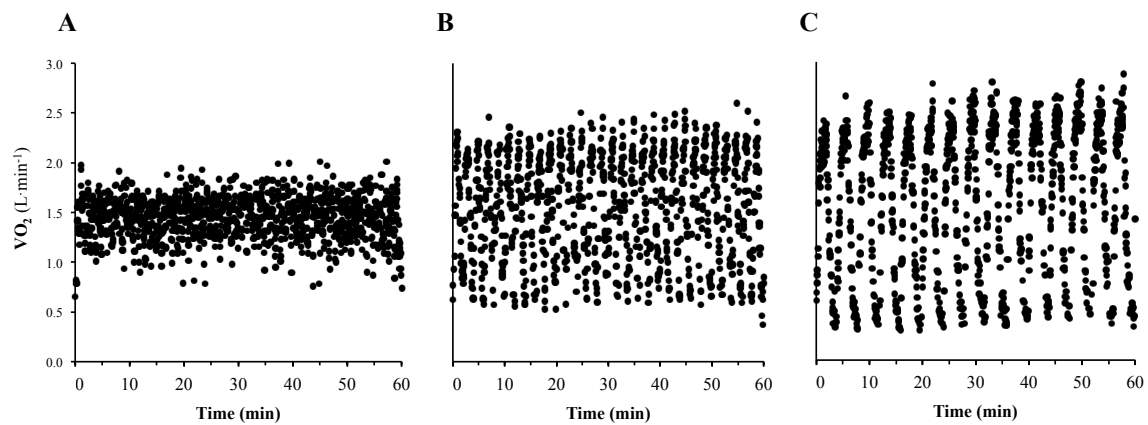


Fig 2. Representative $\dot{V}O_2$ responses. Representative response (subject 10) of breath-by-breath oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) for 30s:30s exercise (A), 60s:60s exercise (B) and 120s:120s exercise (C).

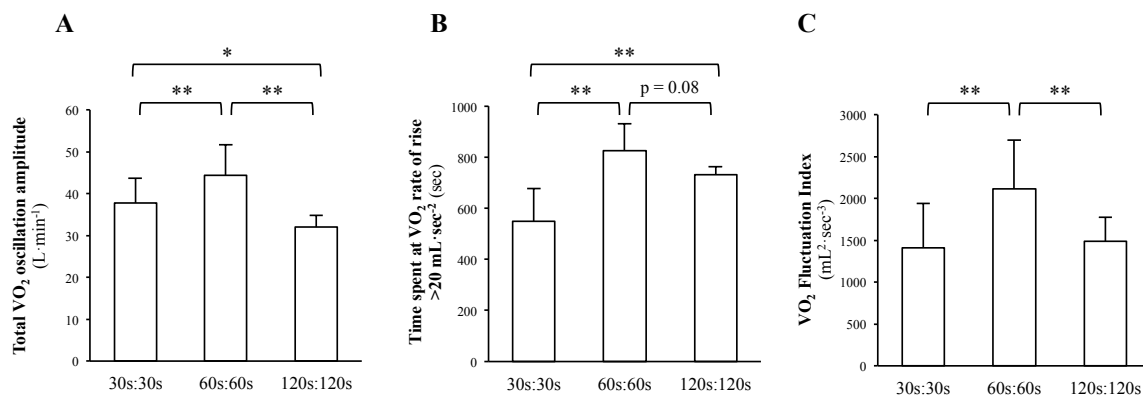


Fig 3. Quantification of $\dot{V}O_2$ fluctuations. Effects of duty-cycle duration (30s:30s, 60s:60s and 120s:120s) on total $\dot{V}O_2$ oscillation amplitude (Panel A), time spent at $\dot{V}O_2$ rate of rise above 20mL·s⁻¹ (Panel B) and Oxygen Fluctuations Index (OFI, Panel C). Values are expressed as mean±SD. *p<0.05 and **p<0.01; n=10 for each group.